

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**



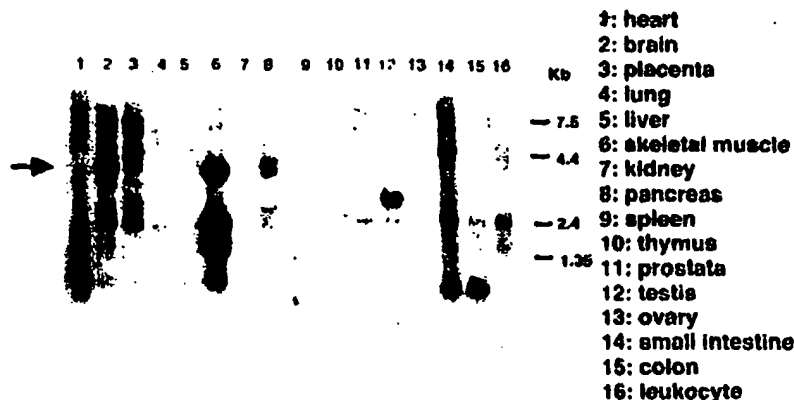
PCT

特許協力条約に基づいて公開された国際出願

<p>(51) 国際特許分類6 C12N 15/12, C07K 14/47, C12Q 1/68, C07K 16/18, C12P 21/08</p>	<p>A1</p>	<p>(11) 国際公開番号 WO99/25827</p> <p>(43) 国際公開日 1999年5月27日(27.05.99)</p>
<p>(21) 国際出願番号 PCT/JP98/03737</p> <p>(22) 国際出願日 1998年8月24日(24.08.98)</p> <p>(30) 優先権データ 特願平9/313211 1997年11月14日(14.11.97) JP</p> <p>(71) 出願人 (米国を除くすべての指定国について) 住友電気工業株式会社 (SUMITOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD.)(JP/JP) 〒541-0041 大阪府大阪市中央区北浜四丁目5番33号 Osaka, (JP)</p> <p>(72) 発明者; および (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ) 中田元巳(NAKATA, Motomi)(JP/JP) 〒244-8588 神奈川県横浜市栄区田谷町1番地 住友電気工業株式会社 横浜製作所内 Kanagawa, (JP) 中村英夫(NAKAMURA, Hideo)(JP/JP) 〒862-0962 熊本県熊本市田迎一丁目4-29-30 Kumamoto, (JP) 吉田光宏(YOSHIDA, Mitsuhiro)(JP/JP) 〒862-0949 熊本県熊本市国府三丁目3-27-102 Kumamoto, (JP)</p>	<p>佐谷秀行(SAYA, Hideyuki)(JP/JP) 〒862-0970 熊本県熊本市渡鹿一丁目16-6-31 Kumamoto, (JP)</p> <p>(74) 代理人 弁理士 長谷川芳樹, 外(HASEGAWA, Yoshiki et al.) 〒104-0031 東京都中央区京橋二丁目13番10号 京橋ナショナルビル6F 創英国際特許事務所 Tokyo, (JP)</p> <p>(81) 指定国 CA, US.</p> <p>添付公開書類 国際調査報告書</p>	

(54)Title: NEURALIZED PROTEIN, POLYNUCLEOTIDE ENCODING THE SAME, AND ANTIBODY RECOGNIZING THE SAME

(54)発明の名称 ニューラライズド蛋白質、該蛋白質をコードするポリヌクレオチドおよび該蛋白質を認識する抗体



(57) Abstract

A gene causative of nerve mutation located in a site in the human tenth chromosome frequently suffering from deletion and having been identified; a protein (a nerve mutation factor) encoded by this gene; and an antibody against this protein. Because of showing a high homology with a *Drosophila* neuralized gene, this human gene causative of nerve mutation is a human homolog of the neuralized gene. Also, provision is made of a mouse neuralized gene; a protein encoded by this gene; and an antibody against the same.

(57)要約

- 本発明は、10番染色体の中で欠失の頻度が多い箇所を同定し、その部分に位置する神経変異原因遺伝子を同定し、該遺伝子を提供する。また、該遺伝子がコードする蛋白質（神経変異因子）を提供する。さらに該蛋白質に対する抗体を提供する。すなわち、ヒト10番染色体の中で欠失の頻度が多い箇所に存在するヒト神経変異原因遺伝子を提供する。該ヒト神経変異原因遺伝子はショウジョウバエのニューライズド遺伝子とホモロジーが高く、ニューライズド遺伝子のヒトホモログである。また、マウスにおけるニューライズド遺伝子も提供する。また、該遺伝子がコードする蛋白質、さらに該蛋白質に対する抗体を提供する。

PCTに基づいて公開される国際出願のパフレット第一頁に掲載されたPCT加盟国を同定するために使用されるコード(参考情報)

AE	アラブ首長国連邦	ES	スペイン	LI	リヒテンシュタイン	SG	シンガポール
AL	アルバニア	FI	フィンランド	LK	スリ・ランカ	SI	スロヴェニア
AM	アルメニア	FR	フランス	LR	リベリア	SK	スロヴァキア
AT	オーストリア	GA	ガボン	LS	レソト	SL	シエラ・レオネ
AU	オーストラリア	GB	英国	LT	リトアニア	SN	セネガル
AZ	アゼルバイジャン	GD	グレナダ	LU	ルクセンブルグ	SZ	スワジランド
BA	ボスニア・ヘルツェゴビナ	GE	グルジア	LV	ラトヴィア	TD	チャード
BB	バルバドス	GH	ガーナ	MC	モナコ	TG	トーゴ
BE	ベルギー	GM	ガンビア	MD	モルドヴァ	TJ	タジキスタン
BF	ブルキナ・ファソ	GN	ギニア	MG	マダガスカル	TM	トルクメニスタン
BG	ブルガリア	GW	ギニア・ビサウ	MK	マケドニア旧ユーゴスラヴィア	TR	トルコ
BJ	ベナン	GR	ギリシャ		共和国	TT	トリニダード・トバゴ
BR	ブラジル	HR	クロアチア	ML	マリ	UA	ウクライナ
BY	ベラルーシ	HU	ハンガリー	MN	モンゴル	UG	ウガンダ
CA	カナダ	ID	インドネシア	MR	モーリタニア	US	米国
CF	中央アフリカ	IE	アイルランド	MW	マラウイ	UZ	ウズベキスタン
CG	コンゴ	IL	イスラエル	MX	メキシコ	VN	ヴェトナム
CH	スイス	IN	インド	NE	ニジェール	YU	ユーゴスラビア
CI	コートジボワール	IS	アイスランド	NL	オランダ	ZA	南アフリカ共和国
CM	カメルーン	IT	イタリア	NO	ノルウェー	ZW	ジンバブエ
CN	中国	JP	日本	NZ	ニュージーランド		
CU	キューバ	KE	ケニア	PL	ポーランド		
CY	キプロス	KG	キルギスタン	PT	ポルトガル		
CZ	チェッコ	KP	北朝鮮	RO	ルーマニア		
DE	ドイツ	KR	韓国	RU	ロシア		
DK	デンマーク	KZ	カザフスタン	SD	スーダン		
EE	エストニア	LC	セントルシア	SE	スウェーデン		

明細書

ニューラライズド蛋白質、該蛋白質をコードするポリヌクレオチドおよび該蛋白質を認識する抗体

技術分野

- 5 本発明は、ショウジョウバエのニューラライズド蛋白質のホモログ蛋白質および該ホモログ蛋白質をコードするポリヌクレオチドに関する。また、前記ポリヌクレオチドのアンチセンスポリヌクレオチドに関する。また、前記ホモログ蛋白質を認識する抗体に関する。

背景技術

- 10 脊椎動物の中でもヒトは最も高度に分化した神経系を持つ生物である。しかし、それについての解析はその複雑な機構のため遅れている。特に脳神経系に発生する腫瘍については、他の腫瘍に比べその解析が遅れている。脳神経系においては、悪性腫瘍はもちろんのこと、良性腫瘍であっても発生部位によっては患者の生命を脅かすことがあり、脳神経腫瘍の発生機序の解明の進展が待たれている。
- 15 現在まで、脳神経系での腫瘍、とりわけ悪性グリオーマの異常は、10番染色体の異常に由来することが知られている。しかし、具体的な10番染色体の欠失等の異常と臨床症状の関連は明らかになっていない。

- 一方、ショウジョウバエでは、神経発生の解析の過程で多くの突然変異体が得られており、その遺伝学的解析が進んでいる。その結果、これまでにノッチ (Notch)、デルタ (Delta)、ビッグブレイン (big brain)、ニューラライズド (neuralized)、マスターマインド (master mind)、アーモンデックス (almondex)、エンハンサーオブスプリット (Enhancer of split) 等が、突然変異の原因遺伝子でないかとされている。
- 20

- 25 上記遺伝子のうちで、ノッチ、デルタおよびエンハンサーオブスプリットについてはヒトのホモログが取れている。

発明の開示

本発明は、脳神経系での腫瘍と10番染色体の異常を明らかにするため、10番染色体の中で欠失の頻度が多い箇所を同定し、その部分に位置する神経変異原因遺伝子を同定し、該遺伝子を提供することを課題とする。また、該遺伝子がコードする蛋白質（神経変異因子）を提供すること、さらに該蛋白質に対する抗体を提供することを課題とする。

すなわち、本発明は、ヒト10番染色体の中で欠失の頻度が多い箇所に存在するヒト神経変異原因遺伝子を提供する。また、該ヒト神経変異原因遺伝子とホモロジーのあるマウス神経変異原因遺伝子を提供する。これらの遺伝子はショウジョウバエのニューライズド遺伝子とホモロジーが高く、それぞれニューライズド遺伝子のヒトホモログおよびマウスホモログである。本発明により、従来ショウジョウバエで知られていたニューライズド遺伝子がヒトやマウスといった脊椎動物、より具体的には哺乳類動物にも存在することが明らかとされた。

また、本発明は、前記塩基配列の相補塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチドをも提供する。

また、本出願において、ニューライズド蛋白質の作製方法が開示される。具体的には、ニューライズドcDNAを導入した形質転換体にニューライズド蛋白質を作製させる方法が開示される。また、その作製方法により作製したニューライズド蛋白質が開示される。また、ニューライズド蛋白質のアミノ酸配列のうち1または複数のアミノ酸を置換、欠失または付加したニューライズド蛋白質の変異体の作製方法および該作製方法により作製されたニューライズド蛋白質の変異体が開示される。

また、本発明は、前記ニューライズド蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたはニューライズド蛋白質変異体をコードするポリヌクレオチドの塩基配列の相補塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチドをも開示するものである。アンチセンスポリヌクレオチドはポリヌクレオチドに含まれるものであるが、本

明細書において、特にアンチセンス鎖の塩基配列からなるポリヌクレオチドであることを明示する場合にアンチセンスポリヌクレオチドという。アンチセンスポリヌクレオチドは、代表的なものとしてアンチセンスDNAとアンチセンスRNAがある。

5 また、本発明は、ニューラライズド蛋白質もしくはニューラライズド蛋白質変異体をコードするポリヌクレオチドの全部または12塩基以上からなる一部であるポリヌクレオチドを開示するものである。

 このポリヌクレオチドは、コード領域の部分のものについては、それぞれニューラライズド蛋白質またはニューラライズド蛋白質変異体の部分長蛋白質を作製
10 するために使用可能である。また、プローブとしても使用可能である。

 また、本発明は、ニューラライズド蛋白質またはニューラライズド蛋白質変異体のアンチセンスポリヌクレオチドの全部または12塩基以上からなる一部であるアンチセンスポリヌクレオチドを開示するものである。

 このアンチセンスポリヌクレオチドは、それぞれニューラライズド蛋白質または
15 ニューラライズド蛋白質変異体の生合成を阻害することが可能である。また、プローブとしても使用可能である。

 また、本発明は、前記のポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチドを含む）を化学修飾したポリヌクレオチドを開示するものである。

 また、本発明は、DNAプローブを用いたノーザンブロットハイブリダイゼーション法による解析により、ヒトおよびマウスの各組織や各細胞株からニューラ
20 ライズドのmRNAを検出できることおよびこれらの動物で天然にニューラライズドのmRNAが発現していることを開示するものである。

 また、本発明は、前記ヒトニューラライズド遺伝子のホモログ遺伝子がコードするヒトニューラライズド蛋白質のホモログ蛋白質（ショウジョウバエニューラ
25 ライズド蛋白質のホモログ蛋白質でもある）を開示するものである。なお、本明細書において、由来する動物名を示さない場合は、各脊椎動物におけるニューラ

ライズド蛋白質を集散的に指す。前記のニューラライズド蛋白質は、ニューラライズド遺伝子を導入した形質転換体に作製させることが可能である。

本発明は、ヒトニューラライズドをコードするポリヌクレオチド、マウスニューラライズドをコードするポリヌクレオチドまたは12塩基以上からなるそれらの一部（コード領域の部分）をプローブとして用いて、他の脊椎動物、好ましくは哺乳類動物のcDNAライブラリーからもニューラライズドcDNAを取得する方法およびその方法により得られた哺乳類のニューラライズドcDNAを含むものである。

なお、プローブには、ヒトニューラライズドcDNAの塩基配列とマウスニューラライズドcDNAの塩基配列との間でホモロジーが高い部分の塩基配列からなるcDNAフラグメントまたは該cDNAフラグメントの塩基配列より得られるポリヌクレオチド（一本鎖DNA（アンチセンス鎖を含む）、cDNAに対するRNAまたはそれらが化学修飾されたものを含む）を用いることができる。そして、前記プローブを他の動物のcDNAライブラリーにハイブリダイズさせることにより当該動物におけるニューラライズドcDNAを取得することが可能である。

また、本発明は、前記cDNA（ヒトニューラライズドcDNAおよびマウスニューラライズドcDNA）がコードするヒトニューラライズド蛋白質やマウスニューラライズド蛋白質のホモログ蛋白質であるニューラライズド蛋白質を提供する。

また、本発明は、前記ニューラライズド蛋白質およびニューラライズド蛋白質の変異体を認識する抗体を提供する。本出願において、ニューラライズド蛋白質の抗原性、すなわち、ニューラライズド蛋白質から抗体を作製することが可能であることが開示される。

また、本発明は、ヒトニューラライズド遺伝子について染色体上の位置を開示するものである。

図面の簡単な説明

図1は、ヒト各組織について、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法によりニューラライズド遺伝子の発現を解析した結果を示す電気泳動写真である。

5 図2は、ヒト正常脳組織（3例）、星状膠細胞腫組織（退形成星状膠細胞腫1例、神経膠芽腫3例）および神経膠腫細胞株について、ノーザンブロットハイブリダイゼーションによりニューラライズド遺伝子の発現を解析した結果を示す電気泳動写真である。

10 図3は、正常脳組織、髄芽細胞腫細胞および神経膠腫細胞株について、RT-PCRによりニューラライズド遺伝子の発現を解析した結果を示す電気泳動写真である。

発明を実施するための最良の形態

15 本発明のショウジョウバエニューラライズド蛋白質のホモログ蛋白質は、配列表の配列番号1または3に記載のアミノ酸配列からなる蛋白質に限定されることはなく、これらの蛋白質をコードするポリヌクレオチドまたはそのコード領域の一部、特に配列表の配列番号2または4に記載の塩基配列またはそのコード領域の一部の塩基配列からなるポリヌクレオチドをプローブとして、各動物のcDNAライブラリーから得られるcDNAがコードする蛋白質も本発明に含まれる。

20 ヒトニューラライズド遺伝子とマウスニューラライズド遺伝子との間で、よく保存されている塩基配列は、例えば、配列表の配列番号2に記載のヒトニューラライズドcDNAの塩基配列の576位のGから938位のCまでの配列であり、配列表の配列番号4に記載のマウスニューラライズドcDNAの塩基配列の82位から446位に相当する。

25 この塩基配列からなるDNAをプローブとして用いて、以下の操作により、目的とする動物のcDNAライブラリーから全長のニューラライズド遺伝子を得ることができる。

1) プローブとするDNAをTakara MEGA LABELキット（登

録商標、宝酒造社製）を用いて取扱説明書の通りに標識する。

2) 次に、下記の組成のDNA反応液を調製し、この液を37℃で30分間インキュベートした後、70℃で10分間熱処理し、酵素を失活させる。

	DNAプローブ (2 pmol/μl)	2 μl
5	10倍ホスホライレイション緩衝液	2 μl
	[γ- ³² P] ATP (370 MBq/ml) (アマシャム製)	5 μl
	T4 ポリヌクレオチドキナーゼ	1 μl
	合計	10 μl

10 3) TE50 (50mM Tris-HCl pH8.0, 1mM EDTA) で平衡化されたSephadex G-25 (登録商標、ファルマシア社製) を1.5mlポリブレップカラム (バイオラッド社製) にベッドボリュームが1mlになるように詰め、2) で熱処理をしたDNA反応液を該カラムに載せる。

15 4) その後、200 μl TE50Eをカラムに4回流し、2回目の200 μlで溶出した画分から標識化DNAプローブを得る。

20 5) 上記で得られた標識化DNAプローブ画分のうち150 μlを、ニトロセルロース膜上に固定したブランクのcDNAプローブ (cDNAライブラリーのニトロセルロース膜上への固定は、Molecular Cloning 2nd Edition (Cold Spring Harbor Laboratory Press、1989年) 9.38-9.40ページに記載の方法にしたがって行える。) と以下の条件でハイブリダイズさせる。

①プレハイブリダイゼーション

	6×SSC
	5×Denhardt's
25	0.05% ピロリン酸ナトリウム
	100 μg/ml 変性ニシン精子 (denatured herrin

g sperm DNA)

0.5% SDS

総液量 50 ml

反応温度 37 °C

5 反応時間 1 時間

②ハイブリダイゼーション

6 × SSC

1 × Denhardt's

0.05% ピロリン酸ナトリウム

10 100 μg/ml 変性ニシン精子 (denatured herring

g sperm DNA)

1 × 10⁶ cpm/ml cDNAプローブ

総液量 50 ml

反応温度 42 °C

15 反応時間 18 時間

6) ハイブリダイズの終了したニトロセルロース膜を以下の条件で1回ずつ洗
浄する。

① 6 × SSC、0.1% SDS 500 ml

温度 40 °C

20 時間 20 分間

② 3 × SSC、0.1% SDS 500 ml

温度 42 °C

時間 20 分間

7) 洗浄したニトロセルロース膜をX線フィルム (例えば、コダック社製 XA
25 R 5 フィルム) に -80 °C で一晩露光し、オートラジオグラフを撮影する。

8) 得られたオートラジオグラフから、陽性のブランクの位置を決定し、対応

する寒天上のブランクをSM溶液に回収する。

9) 回収したブランクは、常法により再度NZY寒天培地上にブランク形成を行わせ、ニトロセルロース膜上に固定する。

10) 5) ~ 9) の過程を3回繰り返し、陽性のブランクは単一なものにする。

5 該ブランクを回収し、100 μ l のSM溶液に懸濁し、ファージを安定化させる。
該ブランクから単離したcDNAがニューライズドcDNAである。

3. ニューライズドcDNAの大量調製

1) SM溶液に懸濁したブランクのファージ50 μ l とY1090 r-大腸菌20 μ l を混合し、37°C、15分間放置する。

10 2) その後、100 μ g/ml アンピシリンを含む10ml NZY培地に1) で混合した溶液を移し、37°Cで6時間培養する。

3) 8000 rpm、5分間遠心分離し、上清を回収する。

4) 該上清に、5M NaClを1ml、ポリエチレングリコール6000を1.1gを加え、溶かす。

15 5) 該溶液を氷上に1時間置き、その後10000 rpm、4°Cで20分間遠心分離を行う。

6) 沈殿を回収し、700 μ l のSM溶液に懸濁する。

7) クロロホルムを500 μ l 加えて攪拌し、残った大腸菌を溶かす。

8) 5000 rpm、10分間遠心分離し、水層を回収する。

20 9) これに、1mg/ml RNase A、5mg/ml DNase I (共にシグマ製) を各1 μ l ずつ加え、37°Cで1時間放置したのち、20%ポリエチレングリコール6000 (0.8M NaCl) を600 μ l 加え、氷上に30分間放置する。

10) 4°Cで、15000 rpm、20分間遠心分離した後、沈殿を回収する。

25 11) この沈殿に500 μ l のSM溶液、50 μ l の5M NaCl、50 μ l の0.5M EDTAを加え、更に、400 μ l のフェノールを加えて攪拌し、

ファージを溶かしてcDNAを遊離させる。

12) 該溶液を室温で15000rpm、5分間遠心分離した後、水層を回収する。これに1mlのエタノールを加え、15000rpm、20分間遠心分離し、液層を捨てる。

5 13) 70%エタノール1mlで沈殿を洗浄し、100 μ lのTE溶液(10mM Tris-HCl (pH8.0)、1mM EDTA)に沈殿を溶かし、DNA溶液を得る。

4. ニューライズドcDNAの塩基配列の決定

10 オートシンクエンサーを用いたダイターミネーター法によりニューライズドcDNAの全塩基配列を決定する。

15 なお、シーケンスの結果、コード領域全長を含むDNA(以下完全長DNAということがある)が得られなかったことが分かった場合、コード領域をカバーするようにDNAの組み合わせを選び、それらのDNAのオーバーラップする部分に含まれる適当な制限酵素サイトで該DNAを切断して繋ぎ合わせることで、完全長DNAを得ることができる。また、コード領域全長を含むようにプライマーを設計して、該プライマーを用いて、目的とする脊椎動物、好ましくは哺乳類動物のcDNAライブラリーを鋳型としてPCRを行うことで、完全長DNAを得ることもできる。

5. アミノ酸配列の決定

20 4. で決定した塩基配列から、ニューライズドcDNAのアミノ酸配列を決定する。

6. 形質転換体の作製

25 実施例1の9.と同様にして上記で得たニューライズドcDNAを適当なベクター(例えば、TAクローニングベクター)に挿入した後、宿主(例えば、大腸菌)に導入することで形質転換体を作製することができる。

自然の変異によりまたは人工の変異(例えば、Molecular Clon

ing 2nd Edition 15.1-15.113ページに記載の方法)により、ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの主たる機能に変化を与えることなく、該ポリヌクレオチド変化させることが可能である。この方法により、
5 アミノ酸配列における一または複数のアミノ酸を置換、欠失または付加したアミノ酸配列からなる蛋白質、すなわちニューライズド蛋白質の変異体を作製することが可能である。

サイトダイレクテッドミュータジェネシスの手法により、変異体を作製する場合は、一度の操作では、通常数個のアミノ酸を置換、欠失または付加することができる。この操作を複数回繰り返すことで、さらに多くのアミノ酸を置換、欠失
10 または付加することができ、好みの変異体を作製することができる。本発明のニューライズとその変異体の間のホモロジーは、アミノ酸レベルで75%以上であることが好ましく、90%以上であればより好ましく、95%以上であればさらに好ましい。

15 本発明のニューライズド蛋白質の変異体のアミノ酸配列は、該変異体をコードする遺伝子の塩基配列から決定することが可能である。例えば、市販のプログラム（例えば、Genetix-Mac（登録商標、ソフトウェアディベロプメント社製）を用いて可能である。

20 遺伝暗号の縮重により、ポリヌクレオチドから生産されたポリペプチドのアミノ酸配列を変えることなく、該ポリヌクレオチドの塩基配列の少なくとも一部の塩基を他の種類の塩基に置換することができる。したがって、本発明のニューライズド蛋白質をコードするポリヌクレオチドとは、縮重の全てのパターンを含むものである。

25 配列表の配列番号2に記載の塩基配列からなるDNAは、天然に存在するヒトニューライズドcDNAであり、配列表の配列番号4に記載の塩基配列からなるDNAは、天然に存在するマウスニューライズド遺伝子である。

本発明は、前記ニューラライズド蛋白質をコードするポリヌクレオチドのコード領域のアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチドおよびその誘導体を含むものである。該アンチセンスポリヌクレオチドは、ニューラライズドをコードするポリヌクレオチドにハイブリダイズすることが可能なものであり、それがハイブリダイズするポリヌクレオチドがコード領域のポリヌクレオチドであれば該ポリヌクレオチドがコードするポリペプチドの生合成を阻害することが可能である。

ポリペプチドの生合成を阻害するためのアンチセンスポリヌクレオチドは、15塩基以上からなることが好ましい。一方、細胞内に全長のアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませるのは、あまりに長くても不適である。細胞内にアンチセンスポリヌクレオチドを取り込ませ、ニューラライズド蛋白質の生合成を阻害させる場合、12塩基以上30塩基以下、好ましくは15塩基以上25塩基以下、より好ましくは18塩基以上22塩基以下の塩基からなるアンチセンスポリヌクレオチドを用いるのがよい。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドまたはその一部分は、塩基、リン酸、糖からなるヌクレオチドが複数結合したものが、天然には存在しないものを含めて全て含まれる。代表的なものは、アンチセンスDNAとアンチセンスRNAである。

本発明のアンチセンスポリヌクレオチドについて、公知のアンチセンス技術を用いて、目的のDNAやmRNAとの結合力、組織選択制、細胞透過性、ヌクレアーゼ耐性、細胞内安定性の高い様々なアンチセンスポリヌクレオチド誘導体が得られる。

ハイブリダイズのし易さの点では、一般的には、ステムループを形成している領域の塩基配列に相補的な塩基配列を持つアンチセンスポリヌクレオチドまたはその誘導体を設計するとよいとされている。本発明のアンチセンスポリヌクレオチドおよびその誘導体は、必要に応じ、ステムループを形成することが可能であ

る。

また、翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の配列に相補的な配列を有するようなアンチセンスポリヌクレオチドは、一般に高い発現抑制効果が期待できる。したがって、本発明のアンチセンスポリ

5 ヌクレオチドまたはその誘導体であって、ニューラライズドをコードする遺伝子またはmRNAの翻訳開始コドン付近、リボソーム結合部位、キャッピング部位、スプライス部位の相補的な配列を含むものは、高い発現抑制効果が期待される。

現在一般的に知られている誘導体は、ヌクレアーゼ耐性、組織選択性、細胞透過性、結合力の少なくとも一つが高められた誘導体であることが好ましい。特に

10 好ましくは、フォスフォロチオエート結合を骨格構造として有する誘導体である。本発明のポリヌクレオチドおよびその誘導体についても、これらの機能または構造を有する誘導体が含まれる。

天然型のアンチセンスポリヌクレオチドであれば、化学合成機を使用して合成したり、ニューラライズドをコードする遺伝子を鋳型とするPCR法により本発

15 明のアンチセンスポリヌクレオチドを作製することができる。また、メチルフォスフォネート型やフォスフォロチオエート型等、誘導体の中には、化学合成できるものもある。この場合には、化学合成機に添付されている説明書にしたがって操作を行い、得られた合成産物を逆相クロマトグラフィー等を用いたHPLC法により精製することによっても、目的のアンチセンスポリヌクレオチドまたはそ

20 の誘導体を得ることができる。

本発明のニューラライズドをコードするポリヌクレオチド、そのアンチセンスポリヌクレオチドまたはそれらの一部（連続する12塩基以上の塩基配列からなるポリヌクレオチド）であるポリヌクレオチドは、cDNAライブラリー等からニューラライズド遺伝子をスクリーニングするためのプローブとして使用可能で

25 ある。対象とする動物の種がプローブとするポリヌクレオチドが由来する動物の種と同じ場合は、非コード領域の部分であっても使用可能である。このときGC

含有率が30ないし70%のものが好適に使用可能である。また、連続する15塩基以上の塩基配列からなるポリヌクレオチドが特に好ましい。プローブとして用いる該ポリヌクレオチドは誘導体であってもよい。通常、上記の塩基数以上の配列は特異性のある配列であると認識されている。該プローブを用いたスクリーニングにおいて使用するcDNAライブラリーとしては、mRNAから作製されたものが好ましく使用できる。これらのcDNAライブラリーからランダムサンプリングにより選択された一群のcDNAを検索の試料とすることができる。また、市販のものでも使用可能である。

例えば、配列表の配列番号2または4に記載の塩基配列のうちの連続する12塩基以上の塩基配列からなるDNAまたは該DNAにハイブリダイズするポリヌクレオチド（アンチセンスポリヌクレオチド）、cDNAライブラリー等からニューライズド遺伝子をスクリーニングするためのプローブとして使用可能である。

また、本発明のニューライズドをコードするポリヌクレオチド、そのアンチセンスポリヌクレオチドまたはそれらの一部であるポリヌクレオチドをプローブとして、各組織由来のmRNAについてノーザンブロットハイブリダイゼーションを行うことにより、ニューライズド遺伝子由来のmRNAが発現している組織を見出すことが可能である。

DNA又はRNAを化学合成するときに、側鎖をメチル化すること、あるいはビオチン化すること、またはリン酸基部分のOをS置換すること等の化学的に修飾することはよく知られている。例えば、配列表の配列番号2に記載のDNAを化学合成するときに、該化学修飾を行い、配列表に示されたDNAそのものと異なるものを合成することが可能である。

また、cDNAライブラリーから取得されたcDNAであっても放射性同位体で標識することも可能である。

したがって、本発明のDNA及びRNAは、上記の化学修飾されたDNA、R

NAまたはアンチセンスポリヌクレオチドをその範囲に含むものである。化学修飾されたDNAまたはRNAは、蛋白質をコードする機能またはプローブとしての機能をいずれも発揮可能なものであり、化学修飾されたアンチセンスポリヌクレオチドは、プローブまたは蛋白質の生合成を阻害する機能またはプローブとしての機能をいずれも発揮可能なものである。

プラスミドを大腸菌等の適当な宿主に導入して、形質転換体を得ることは公知の方法により可能である。本発明のニューライズド遺伝子を導入した形質転換体を培養して遺伝子の増幅または蛋白質の発現を行わせ、ニューライズド蛋白質またはニューライズド蛋白質の変異体を作製させることが可能である。次に作製物を回収し、必要に応じて濃縮、可溶化、透析、各種クロマトグラフィー等の操作を行うことにより、本発明のニューライズド蛋白質またはニューライズド蛋白質の変異体を精製することが可能である。

形質転換体の培養については、各種の教科書があり、本発明に記載の塩基配列に基づいてニューライズド蛋白質またはニューライズド蛋白質の変異体を作製させることは、公知の方法により可能である。このとき、宿主としては、大腸菌等の細菌、酵母、動物細胞のいずれも使用可能であるが、特に動物細胞が好ましい。細胞に遺伝子を導入するには、リボソーム法、エレクトロポレーション法等を用いることができる。特に、核内微量注入法を用いることが好ましい。

得られた培養物からニューライズド蛋白質またはニューライズド蛋白質の変異体を精製する精製方法には、免疫沈降法、塩析法、限外濾過法、等電点沈殿法、ゲル濾過法、電気泳動法、イオン交換クロマトグラフィー法、疎水性クロマトグラフィー法や抗体クロマトグラフィー法等の各種アフィニティークロマトグラフィー、クロマトフォーカシング法、吸着クロマトグラフィー法および逆相クロマトグラフィー法等があり、適宜選択して行えばよい。

また、製造段階において、製造するニューライズド蛋白質またはニューライズド蛋白質の変異体は、他のポリペプチドとの融合ペプチドとして形質転換体

に作製させてもよい。この場合は、精製工程において、ブロムシアン等の化学物質やプロテアーゼ等の酵素で処理して、ニューライズド蛋白質またはニューライズド蛋白質の変異体を切り出す操作が必要になる。

本発明は、ニューライズド蛋白質の抗原性について、実施例3に例示するように、前記方法により得られたニューライズド蛋白質またはニューライズド蛋白質に特異的なアミノ酸配列からなるオリゴペプチドをニューライズド蛋白質が由来する動物およびヒト以外の動物に免疫することで容易に抗体が得られるものであることを明らかにするものである。したがって、本発明のニューライズド蛋白質を認識する抗体（以降、ニューライズド抗体ということがある）は、
10 ニューライズド蛋白質を該ニューライズド蛋白質が由来する動物およびヒト以外の動物に免疫感作することにより得られる抗体であって、該抗体が該ニューライズド蛋白質を認識することがウェスタンブロット法、ELISA法や免疫染色法（例えば、凍結標本やパラフィン標本の組織染色）等により確認される抗体をその範囲内に含む。

15 また、免疫原として、蛋白質の一部であっても該蛋白質の一部をウシ血清アルブミンなどの他のキャリアー蛋白質に結合させたものを用いることは、よく用いられる方法である。該蛋白質の一部は、例えばペプチド合成機を用いて合成してもよい。なお、蛋白質の一部としては、8アミノ酸残基以上であることが好ましい。

20 抗原性が明らかとなった物質については、免疫感作によってポリクローナル抗体が得られるならば、該免疫した動物のリンパ球を用いたハイブリドーマによりモノクローナル抗体が産生されることはよく知られている（『Antibodies A Laboratory Manual』（Cold Spring Harbor Laboratory Press、1988）Chapter
25 6）。したがって本発明のニューライズド抗体はモノクローナル抗体もその範囲内に含むものである。

本発明においては、抗体は活性フラグメントをも包含するものである。活性フラグメントとは、抗原抗体反応活性を有する抗体のフラグメントを意味し、具体的には、 $F(a b')$ 、 $F a b'$ 、 $F a b$ 、 $F v$ などを挙げることができる。

例えば、本発明の抗体をペプシンで分解すると $F(a b')$ が得られ、パバインで分解すると $F a b$ が得られる。 $F(a b')$ を2-メルカプトエタノールなどの試薬で還元して、モノヨード酢酸でアルキル化すると $F a b'$ が得られる。 $F v$ は重鎖可変領域と軽鎖可変領域とをリンカーで結合させた一価の抗体活性フラグメントである。

これらの活性フラグメントを保持し、その他の部分を他の動物のフラグメントに置換することでキメラ抗体が得られる。

本発明の抗体は、ニューラライズドの発現等の機能の解明や悪性腫瘍の形成機構の解明のために使用可能である。

ニューラライズドの検出については、抗体を用いる方法、酵素反応を利用する方法が挙げられる。

抗体を用いる方法としては具体的には、①標識されたニューラライズド抗体を用いてニューラライズドを検出する方法、②ニューラライズド抗体および該抗体の標識二次抗体を用いてニューラライズドを検出する方法が挙げられる。標識としては、例えば放射性同位元素($R I$)、酵素、アビジン又はビオチン、もしくは蛍光物質($F I T C$ やローダミン等)が利用される。

酵素反応を利用する方法としては、例えば、 $E L I S A$ 法、免疫凝集法、ウェスタンブロット法を用いた免疫反応分子の同定方法又はそれらに類似する方法が挙げられる。

実施例

以下に実施例を挙げて、より詳細に本発明を説明するが、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

実施例 1

I. 悪性グリオーマにおける10番染色体の欠失位置の同定

(1) 細胞の調製

46例の悪性グリオーマのヒト組織および悪性グリオーマ患者の末梢血を採血した。末梢血はEDTA添加採血管に5cc採血し、ファイコール・ベーク（ファルマシア社製）を用いた比重遠心分離法にて、白血球有核細胞を回収した。組織は、手術で除去した組織片5mm角またはバイオプシーでのサンプルについてコラゲナーゼおよびトリプシン処理を行い細胞浮遊液を調製した。

(2) DNAの調製

得られた細胞浮遊液からキアゲン・ブラッドアンドセルカルチャーDNAキット（キアゲン社製）を用いて、添付プロトコールにしたがいDNAを抽出した。

(3) マイクロサテライト解析

得られたDNAについて、10染色体長腕上の16箇所のマイクロサテライトマーカーを色素標識したプライマーを用いて解析した。

その結果、グレードIIIおよびグレードIVの悪性グリオーマにおいて、10番染色体長腕上のマイクロサテライトマーカーのうちのD10S540とD10S566を含む領域の遺伝子のヘテロ性消失（LHO）を高頻度に認めた。

(4) STSマッピング

その後、ホールゲノムラディエイションハイブリッドのパネルおよびYACクローンを用いて、D10S566周辺のSTSマッピングを行った。その結果、D10S566が10q25に存在することおよびその周辺のSTSマーカーの位置関係を明らかにした。

II. ニューライズド遺伝子の同定

1. ESTデータベースの検索

インターネットのESTデータベース（mRNAの断片の配列を登録してあるデータベース、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ihtml>）に登録された配列（EST）から10q24ないし25付近に存

在するEST選別したところ、H82634が選別された。このESTの局在を、さらに、前記ラディエーションハイブリッドのパネルおよびYACクロンのPCRにより決定したところ、H82634がヒト10番染色体上のD10S540とD10S566の間に位置することが判明し、H82634を含む遺伝子が悪性グリオーマの原因遺伝子である可能性が生じた。

2. TIGRデータベースの検索

インターネットのTIGRデータベース (mRNAの断片の配列を登録してあるデータベース、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ihtml>) に登録された配列からH82634とホモロジーのある配列を検索した。その結果、H82635がH82634の相補鎖の配列であることが分かった。この二つの配列から以下の塩基配列A (配列表の配列番号23に記載の塩基配列) を定めた。

塩基配列A :

```
CAGCTGGACG CCCGNTGNA GGCCGTAGAC GTCCACCAGG GCCCAGAGCG
GGTCGGCCGT GCGGACCCGC TGAAGAACAG CATAACAGCC GAGTCGTTGA
TGCGGTGGAA GACACGGCCC TTCTTGTCCA CCCAGAATGC GATGATGTTG
CCCTCATTGC CAAACTCCTC AGGCAGCGCT NTGGCCCAGA AGCCACTCTG
GGACACCAGG TTCGGGGCAG GCGTACTTGG GCAGCGAGTC AGGGTGGATG
CGGGACGGGT CCTTGCTGGT GAAGCCAGCC GCAGGCCCCG CTCCAGCACT
GCTTCTTGGT GATCTTCAGC CTGACTTGCT CGTAGATGAG GACCGGGCGG
TTGCTGAAGG TGATGNCGTT GCAGAAGCTG GCCTGCCTCT TGNACAGCCT
TGTGGCTGAG GTCCATGAGG ATCTGGGAGC CCTTGGTGTG CGGGTGGAAAG
AGCAGCGGCG TGGCTGGGAG CCCCCGCTGG GCAGCACTGC CGGACAGTGC
TTCTGCTTGT GGTGGCATCG GTGAGAAGTG ACGGGGAAGG GGCCCCCGAT
AGAGTCGTGG AGAGTGCTCC GGGTGAT
```

3. プライマーの合成

ヒトcDNAライブラリーから、上記の塩基配列AのDNAフラグメントを取得するために以下のプライマーを合成した。

5' プライマーとしてP1プライマー 5'-TAGACGTCCA CCAGGGCCCA GAC-3' (配列表の配列番号5に記載の塩基配列)、3' プライマーとしてP2プライマー 5'-CGGAGCACTC TCCACGACTC TAT-3' (配列表の配列番号6に記載の塩基配列) を設計し、DNA合成機 (ABI社製、モデル392) にて合成した。合成したプライマーは、蒸留水で20 pmol/ μ lに調製した (以降のプライマーの合成も同様に行った。)。

4. PCR

10 cDNAライブラリーには、ヒト胎児脳のcDNAライブラリー (クローンテック社製) を用い、以下の条件でPCRを行った。

cDNA	0.8 μ l
dNTPmix (各2.5 mM)	0.6 μ l
P1プライマー	0.6 μ l
15 P2プライマー	0.6 μ l
3.3 \times PCR緩衝液	4.5 μ l
25 mM MgCl ₂	0.72 μ l
蒸留水	6.68 μ l
合計	14.5 μ l

20 上記組成の液にミネラルオイル15 μ lを重層し、94 $^{\circ}$ Cで5分間放置した後、TaqポリメラーゼXL0.5 μ l (登録商標、宝酒造社製) を加え、「94 $^{\circ}$ Cで30秒間、60 $^{\circ}$ Cで30秒間、続いて72 $^{\circ}$ Cで1分間」のサイクルを35回繰り返し反応させた。最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間断片の伸長反応を行いPCRを完了した。

25 反応後、PCR産物についてミニゲル電気泳動を1.5%アガロースゲルで行った。約0.6 kbのニューライズド蛋白質断片をコードする遺伝子と考えら

れるバンドを切り出しPCR産物を回収した。さらに、前記回収物の一部について前記ミニゲル電気泳動を再度行い、約0.6 kbにバンドが現れることを確認した。以下、このDNA断片を、以降、フラグメントAという。

4. ベクターへの組み込み

- 5 フラグメントAをpCRIITAクローニングベクターキット（インビトロゲン社製）を用いて、下記条件でサブクローニングした。

	滅菌蒸留水	5 μ l
	10 \times ライゲーション緩衝液	1 μ l
	pCRIIベクター	2 μ l
10	DNA断片	1 μ l
	T4DNAリガーゼ	1 μ l
	合計	10 μ l

14 $^{\circ}$ Cで一晩反応を行い、ライゲーション混合物を得た。

5. 形質転換

- 15 TAクローニングキットを用いて形質転換を行った。

①氷上で大腸菌50 μ lに0.5 Mの2-メルカプトエタノール2 μ lおよび前記4.で調製したライゲーション混合物を添加し30分間放置した後、42 $^{\circ}$ Cの湯浴中で225 rpmで振盪しながらインキュベートした。

- 20 ②次いで、アンピシリン、X-GalおよびIPTGを添加したLB寒天プレートに、前記大腸菌を拡散した。37 $^{\circ}$ Cで18時間インキュベートしたところ、白と青のコロニーが出現した。

6. ミニ培養

- 25 前記のプレートから白いコロニーを4個選択し、それぞれ1コロニーにつき3 mlのLB培地（アンピシリン添加）が入ったチューブに入れ、これを一晩37 $^{\circ}$ Cで振盪培養した。

7. ミニ調製

アルカリ法（例えば、前掲のMolecular Cloning 2nd Editionの1.25-1.28ページに記載の方法）でプラスミドを調製した。

8. DNAシーケンス

- 5 前記7. で調製したプラスミドについて1 μ lを取り、99 μ lのTEにて希釈した。260nmでの吸光度（A₂₆₀）を測定し、DNA値を計算した（A₂₆₀の値1.0を50 μ g/mlとして算出した）。A₂₆₀値よりDNAが1 μ g/mlとなるようにプラスミドをTEにて希釈した。ABI社製のオートシンクエンサーモデル373Sを使用してダイターミネーター法により、フラグメントAの塩基配列を決定した。

9. 5' 伸長反応

- 15 フラグメントAの塩基配列からP3プライマー5'-AGCACTGCCG GACAGTGCTT CTG-3'（配列表の配列番号7に記載の塩基配列）を合成した。このプライマーを用いて、ヒト胎児脳cDNAライブラリーを鋳型としてシングルPCRを下記の条件で行った。

cDNA	1 μ l
dNTPmix	0.6 μ l
P3プライマー	1 μ l
3.3 \times PCR緩衝液	4.5 μ l
25mM MgCl ₂	0.72 μ l
蒸留水	6.68 μ l
合計	14.5 μ l

- 25 前記組成の液にミネラルオイル15 μ lを重層し、94 $^{\circ}$ Cで5分間放置した後、TaqポリメラーゼXL0.5 μ l（登録商標、宝酒造社製）を加え、「94 $^{\circ}$ Cで30秒間、60 $^{\circ}$ Cで30秒間、続いて72 $^{\circ}$ Cで1.5分間」のサイクルを50回繰り返し反応させた。続いて55 $^{\circ}$ Cで2分間、最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間断片の

伸長反応を行いPCRを完了した。

このPCR産物を鋳型として2度目のPCRを実施した。P4プライマー5'-GTGGTGGCAT CGGTGAGAAG TGA-3'（配列表の配列番号8に記載の塩基配列）を合成した。このプライマーと、5'のプライマーとしてT3プライマー5'-ATTAACCTC ACTAAAG-3'（配列表の配列番号9に記載の塩基配列）を用いて、下記の条件でPCRを行った。

	PCR産物	1 μ l
	dNTPmix	1 μ l
	P4プライマー	1 μ l
10	T3プライマー	1 μ l
	3.3 \times PCR緩衝液	7.5 μ l
	25mM MgCl ₂	1.2 μ l
	蒸留水	11.8 μ l
	合計	24.5 μ l

- 15 前記組成の液にミネラルオイル20 μ lを重層し、94°Cで5分間放置した後、TaqポリメラーゼXL0.5 μ l（登録商標、宝酒造社製）を加え、「94°Cで30秒間、60°Cで30秒間、続いて72°Cで1分間」のサイクルを40回繰り返して反応させた。続いて55°Cで2分間、最後に72°Cで10分間断片の伸長反応を行いPCRを完了した。このDNA断片を、以降、フラグメントBという。

20 10. 3'伸長反応

フラグメントAの塩基配列からP5プライマー5'-GGCCGTGTCT TCCACCGCAT CAA-3'（配列表の配列番号10に記載の塩基配列）を合成した。このプライマーを用いて、ヒト胎児脳cDNAライブラリーを鋳型としてシングルPCRを下記の条件で行った。

25	cDNA	1 μ l
	dNTPmix	0.6 μ l

P 5プライマー	1 μ l
3. 3 \times PCR緩衝液	4. 5 μ l
25mM MgCl ₂	0. 72 μ l
蒸留水	6. 68 μ l

5 合計 14. 5 μ l

前記組成の液にミネラルオイル15 μ lを重層し、94℃で5分間放置した後、TaqポリメラーゼXL0. 5 μ l（登録商標、宝酒造社製）を加え、「94℃で30秒間、60℃で30秒間、続いて72℃で1. 5分間」のサイクルを50回繰り返し反応させた。最後に72℃で10分間断片の伸長反応を行いPCRを完了した。

このPCR産物を鋳型として2度目のPCRを実施した。P6プライマー5'-CTCGGCTGTT ATGCTGTTCT TCA-3'（配列表の配列番号11に記載の塩基配列）を合成した。このプライマーと、5'のプライマーとしてT7プライマー5'-AATACGACTC ACTATAG-3'（配列表の配列番号12に記載の塩基配列）を用いて、下記の条件でPCRを行った。

PCR産物	1 μ l
dNTPmix	1 μ l
P6プライマー	1 μ l
T7プライマー	1 μ l
3. 3 \times PCR緩衝液	7. 5 μ l
25mM MgCl ₂	1. 2 μ l
蒸留水	11. 8 μ l
合計	24. 5 μ l

前記組成の液にミネラルオイル20 μ lを重層し、94℃で5分間放置した後、TaqポリメラーゼXL0. 5 μ l（登録商標、宝酒造社製）を加え、「94℃で30秒間、60℃で30秒間、続いて72℃で1分間」のサイクルを40回繰

り返し反応させた。最後に72℃で10分間断片の伸長反応を行いPCRを完了した。これより得られたDNA断片を、以降、フラグメントCという。

11. DNAシーケンス

5 フラグメントBとフラグメントCについて、P4プライマーあるいはP6プライマーをもとにダイターミネーター法でダイレクトシーケンスを行った。

12. 3' 伸長反応

10 フラグメントCの塩基配列をもとに、P7プライマー5'-GTGGACGCCT CGCAGCCGCT TTG-3' (配列表の配列番号13に記載の塩基配列)とP8プライマー5'-CGATGAGTGC ACCATTTGCT ATG-3' (配列表の配列番号14に記載の塩基配列)を合成した。

まずP7プライマーを用いて、ヒト胎児脳cDNAライブラリーを鋳型にして、下記の条件でシングルPCRを行った。

cDNA	1 μ l
dNTPmix	0.6 μ l
15 P7プライマー	1 μ l
3.3×PCR緩衝液	4.5 μ l
25mM MgCl ₂	0.72 μ l
蒸留水	6.68 μ l
合計	14.5 μ l

20 前記組成の液にミネラルオイル15 μ lを重層し、94℃で5分間放置した後、TaqポリメラーゼXL0.5 μ l (登録商標、宝酒造社製)を加え、「94℃で30秒間、60℃で30秒間、続いて72℃で1.5分間」のサイクルを50回繰り返し反応させた。最後に72℃で10分間断片の伸長反応を行いPCRを完了した。

25 このPCR産物を鋳型として2度目のPCRを実施した。P8とT3プライマーを用いて、下記の条件でPCRを行った。

	PCR産物	1 μ l
	dNTPmix	1 μ l
	P8プライマー	1 μ l
	T3プライマー	1 μ l
5	3.3 \times PCR緩衝液	7.5 μ l
	25mM MgCl ₂	1.2 μ l
	蒸留水	11.8 μ l
	合計	24.5 μ l

前記組成の液にミネラルオイル20 μ lを重層し、94 $^{\circ}$ Cで5分間放置した後、
 10 TaqポリメラーゼXL0.5 μ l（登録商標、宝酒造社製）を加え、「94 $^{\circ}$ C
 で30秒間、60 $^{\circ}$ Cで30秒間、続いて72 $^{\circ}$ Cで1分間」のサイクルを40回繰
 り返し反応させた。最後に72 $^{\circ}$ Cで10分間断片の伸長反応を行いPCRを完了
 した。これより得られたDNA断片を、以降、フラグメントDという。

13. DNAシーケンス

15 フラグメントDについて、P8プライマーをもとにダイターミネーター法でダ
 イレクトシーケンスを行った。

14. 全長cDNA化

フラグメントA、B、CおよびDの塩基配列をもとに、センスプライマー5'-AGA
 GCAGCAG AGGTGGCTGC ACT-3'（配列表の配列番号15に記載の塩基配列）を、ア
 ンチセンスプライマー5'-GGCTTGTTCC TCAGCTGGGA CTG-3'（配列表の配列番号1
 20 6に記載の塩基配列）を設定し、これを用いてヒト胎児脳cDNAライブラリー
 を鋳型として、下記の条件でPCRを行った。

	cDNA	1 μ l
	dNTPmix	1 μ l
25	センスプライマー	1 μ l
	アンチセンスプライマー	1 μ l

3. 3×PCR緩衝液	7. 5 μ l
25mM MgCl ₂	1. 2 μ l
蒸留水	11. 8 μ l
合計	24. 5 μ l

- 5 前記組成の液にミネラルオイル15 μ lを重層し、96℃で5分間放置した後、TaqポリメラーゼXL0. 5 μ l（登録商標、宝酒造社製）を加え、「94℃で30秒間、60℃で30秒間、続いて72℃で1. 5分間」のサイクルを40回繰り返して反応させた。最後に72℃で10分間断片の伸長反応を行いPCRを完了した。この全長cDNAをダイターミネーター法でシーケンスした。全長のコード領域を含む目的のcDNAが取れたことを確認し、この遺伝子を、ショウジョウバエのニューラライズド遺伝子のヒトにおけるホモログ遺伝子と認定した。この塩基配列を配列表の配列番号2に示す。またこの遺伝子がコードするヒトニューラライズド蛋白質のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

15. 形質転換体の作製

- 15 上記で得られた全長のヒトニューラライズドcDNAを、プラスミドベクターpBTM116のEcoRI-PstIサイトにHAタグを含む83merのリンカーを挿入したpBTM116HAのBamHI-KpnIサイトに挿入した。このプラスミドベクターを大腸菌DH5 α に導入して、形質転換体を作製した。

実施例2 ニューラライズドmRNAの各組織における発現(1)

- 20 ヒトの各組織のポリA+RNA (mRNA) およびヒトの各種細胞のポリA+RNA (mRNA) それぞれについて、各2 μ gをプロットしたメンブレン (Human Multiple Tissue Northern Blot I、同IIおよびHuman Cancer Cell Line Multiple Tissue Northern Blot (クローンテック社製)) に、ランダムプライムドラベリングキット（登録商標、宝酒造社製）を用いて³²P-CTPで標識化したフラグメントAを、ハイストリンジェンシーの条件下で、M

olecular Cloning A Laboratory Manual
Second Edition 7. 39ページないし7. 52ページの記載
にしたがってハイブリダイズさせ、ノーザンブロットハイブリダイゼーション法
による解析を行った。

- 5 各組織についての結果を図1に示す。ニューラライズド遺伝子が脳および筋肉
組織で発現していることが分かった。

この結果、各細胞については、明らかな発現は見られなかった。

上記の結果より、ニューラライズド遺伝子およびニューラライズド蛋白質は神
経特異的な分子であると考えられる。

- 10 実施例3 ニューラライズドmRNAの各組織における発現(2)

正常脳組織(3例)と星状膠細胞腫組織(退形成星状膠細胞腫1例、神経膠芽
腫3例)と神経膠腫細胞株から、酸-グアニジニウムチオシアネート-フェノー
ル-クロロホルム法により、トータルRNAを抽出した。このRNAをアガロー
ス電気泳動した後、エチジウム-ブロミド染色した。トータルRNAを6%ホル
ムアルデヒド-1%アガロースゲルで変成し、ナイロンメンブレン(Hyb on
d (登録商標) アマシャム社製)に転写した。

- 15

ハイブリダイゼーションは、以下の緩衝液中で42℃で一晩反応させることで
行った。

α -³²P-dCTP標識プローブ(全長のヒトニューラライズドcDNA)

- 20 50mM HEPES (pH7)

0.75M NaCl

50%ホルムアミド

3.5%SDS

5×Denhart's

- 25 2mM EDTA

0.1%SDS

200 μ g/ml サケ精子DNA

フィルターは同じ緩衝液中で、2×SSC、0.1% SDSにより55℃で20分間洗浄した後、1×SSC、0.1% SDSにより55℃20分間洗浄した。

その後、-80℃で三晩X線を照射して感光させた。

- 5 結果を図2に示す。図2から分かるように、ヒトニューラライズドmRNAは正常脳組織と退形成星状膠細胞腫に発現が見られたが、神経膠芽腫および神経膠腫には発現が見られなかった。

実施例4 悪性星状膠細胞腫におけるヒトニューラライズドの変異の解析

1. cDNAの合成

- 10 正常脳組織、髄芽細胞腫細胞Med-3、神経膠腫細胞株(U87MG、U251MG、U138MG、Hs638、TG98、A172、SF126、U373MG、U105MG、NP1、NP2、RBR17T)からトータルRNAを抽出した。

- 15 5 μ gのトータルRNAを20 μ lの以下の組成の反応液中で37℃で1時間インキュベートしてcDNAを合成した。

反応液:

50mM Tris-HCl (pH8.3)、

10mM DTT

10mM KCl

- 20 0.5mM dNTP

30 μ g RNAsin (ギブコBRL社製)

150 μ g superscript II 逆転写酵素 (ギブコBRL社製)

2. RT-PCR

- 25 2 μ gの逆転写酵素生成物について、25 μ lのrTth DNAポリメラーゼ (アプライドバイオシステム社製) を用いて当該酵素の説明書にしたがって、ジーンアンブPCRシステム9600 (パーキンエルマーシートス社製) を使用

して30サイクルのPCRを行った。

PCRのプライマーは以下のプライマーのセットを使用した。

neuS-13:5' -AGCTGGTGCTCCCGGACTGTCTG-3'
(配列表の配列番号19に記載の塩基配列)

5 neuAS-stop:5' -AGCTGGTGCTCCCGGACTGTCTG-3' (配列表の配列番号20に記載の塩基配列)

また、cDNA合成がうまく行われたことを確かめるために、グリセルアルデヒド-3-ホスフェートゲヒドロゲナーゼ (GAPDH) cDNAを以下のプライマーを用いて増幅した。

10 GAPDHセンスプライマー:5' AAGGCTGGGGCTCATTTGCA
G-3' (配列表の配列番号21に記載の塩基配列)

GAPDHアンチセンスプライマー:5' -CCAAATTCGTTGTCA
TACCAGG-3' (配列表の配列番号22に記載の塩基配列)

増幅産物を、2%アガロースゲル上で電気泳動した。

15 この結果を、図3に示す。図から分かるように、正常脳組織、髄芽細胞腫細胞およびU87MGでは、ヒトニューラライズドが増幅されているが、U87MG以外の神経膠腫細胞では、ヒトニューラライズドが増幅されなかった。

実施例5 ニューラライズド蛋白質を認識する抗体の作製

1. 抗原の作製

20 下記のペプチドAおよびペプチドBを合成した。

ペプチドA: 配列表の配列番号1に記載のニューラライズド蛋白質のアミノ酸配列の123番目のLeuから143番目のCysまでの21アミノ酸からなるペプチド。

25 ペプチドB: 配列表の配列番号1に記載のニューラライズド蛋白質のアミノ酸配列の272番目のProから291番目のAspまでの20アミノ酸のN末端にシステイン (Cys) を付加したアミノ酸からなるペプチド。

システインの付加はスカシ貝ヘモシアニン (KHL) と結合させるために付加した。合成は岩城硝子 (株) に委託した。

合成したペプチド 2 mg をマレイミド化 KHL (ピアス社製) 2 mg に結合させた。反応はピアス社のキットの説明書に記載の方法にしたがった。

5 2. 免疫

抗原 (ペプチド A およびペプチド B) について、抗原液 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$) 100 μl 、PBS 0.5 ml を及びフロイントコンプリートアジュバンド (ディフコ社製) 0.5 ml をシリンジに取り、混合してエマルジョンとし、ウサギの背に 4 箇所に分けて皮下接種した。

10 1 週間後、2 回目の免疫を行った。2 回目からはアジュバンドをフロイントインコンプリートアジュバンド (ディフコ社製) に変えて免疫を行った。その他の操作は 1 回目と同様である。2 回目以降は 1 週間間隔を開けて、合計 6 回免疫を行った。

3. 抗体の精製

15 最終免疫の 1 週間後、採血した。この血液を室温で 3 時間静置し、十分に血液凝固を行った後、3,000 rpm で 5 分間遠心分離を行い、上清 (血清) を回収した。

20 この血清に飽和硫酸を最終濃度が 50 % になるように加えて塩析した。このサンプルを遠心分離して、抗体が含まれる画分を沈殿させた。その後、沈殿物を PBS に溶解し、さらに PBS に対して塩析した。

その後、プロテイン G セファロースカラム (登録商標、ファルマシア社製) を用いて、抗体をアフィニティー精製した。その結果、全量で 370 mg の IgG 画分が得られた。

25 IgG 画分について、免疫に使用したペプチドを NHS-活性化セファロース (ファルマシア社製) に添付のマニュアルにしたがい結合させて作製したカラムを使用してアフィニティー精製した。その結果、全量で 5 mg の精製抗体が得ら

れた。

4. 抗体の力価の測定

得られた精製抗体の力価をELISAにて測定した。

(1) 抗原液 (ペプチドAおよびペプチドB) をそれぞれ $25 \mu\text{g}/\text{ml}$ に PBS で希釈して、96 ウェル ELISA プレート (キセノバインド (Xenobind) 登録商標、キセノボア社製) の各ウェルに $50 \mu\text{l}$ ずつ分注し、 4°C で一晩放置した。

(2) 抗原液を捨て、蒸留水で4倍に希釈したブロックエース (登録商標、大日本製薬社製) を各ウェルに $200 \mu\text{l}$ ずつ分注し、室温で2時間放置することによりブロッキングを行った。

(3) ブロッキング液を捨て、一次抗体として精製抗体を添加した。精製抗体は、96 ウェルの1列目から順に、 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $2.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ 、・・・とPBSで倍々希釈した液を、12列目まで各ウェルに $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した。12列目の抗体濃度は約 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ となった。なお、コントロールには、免疫していないウサギから精製したIgGを用いた。各抗体の分注後、室温で1時間反応させた。

(4) 抗体液を捨て、 0.05% Tween 20 / PBS でプレートを4回洗浄し、次いで二次抗体液としてPBSで1000倍希釈したビオチン化ウサギIgG抗体 (ベクター社製) 各ウェルに $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した。その後、室温で30分間反応させた。

(5) 二次抗体を捨てた後、 0.05% Tween 20 / PBS でプレートを4回洗浄し、1000倍希釈したABC液 (ベクター社製) を各ウェルに $50 \mu\text{l}$ ずつ分注した。その後、室温で30分間放置した。

(6) ABC液を捨てた後、 0.05% Tween 20 / PBS でプレートを4回洗浄し、オルトフェニレンジアミン (OPD) - H_2O_2 / PBS を各ウェルに $100 \mu\text{l}$ ずつ分注した。十分に発色させた後、2N硫酸で反応を止めた後、

490 nmの吸光度をマイクロプレートリーダー（バイオラッド社製）にて測定した。

この結果、ペプチドAを免疫して得られた抗体（以下抗体Aということがある）およびペプチドB（以下抗体Bということがある）を免疫して得られた抗体のいずれも、抗体の力価はコントロールに比べて高かった。

実施例6 ウェスタンブロット

(1) プラスミドベクターpBTM116のEcoRI-PstIサイトにH Aタグを含む83merのリンカーを挿入したpBTM116HAのBamHI-KpnIサイトにヒトニューラライズドcDNAのコード領域を挿入した。このプラスミドをCOS細胞に導入した。

(2) 前記ニューラライズドcDNAを導入したCOS細胞、その親株（ニューラライズド遺伝子を導入していない細胞）、ヒトの脳組織および筋肉組織について、細胞および組織を回収後溶解させた。細胞は 1×10^6 個、脳組織はクローンテック社製のヒューマンブレインプロテインメドレー（Human Brain protein Medley）を用いた。細胞溶解液は、68mM Tris-HCl、14%グリセロール、3%SDS、0.1M DTT、 $10 \mu\text{g/ml}$ 大豆トリプシンインヒビター、 $1 \mu\text{g/ml}$ アプロチニン、1mMフェニルメチルスルフォニルフロライド（PMSF）、 $1 \mu\text{g/ml}$ ロイペプチンを用いた。細胞溶解液を細胞のペレットに $100 \mu\text{l}$ 加えてよく攪拌して溶かした。10分間煮沸した後、 15000 rpm で10分間遠心分離を行い、上清液を回収した。

(3) 上清液 $10 \mu\text{l}$ について10-20%のグラジエントゲルで電気泳動した。

(4) 電気泳動後、トランスブロットシステム（マリソル社製）を用い、ニトロセルロース膜に転写した。

(5) ニトロセルロース膜を10%スキムミルク/PBS、0.1%Tween

n 20に浸し、1時間放置し、ブロッキングした。その後、0.3% Tween 20/PBSで5分間ずつ2回洗浄した。

(6) 実施例3で作製した抗ニューラライズド抗体を $1\mu\text{g}/\text{ml}$ にPBSで希釈した後、ニトロセルロース膜に加え、室温で40分間反応させた。その後、
5 0.3% Tween 20/PBSで5分間ずつ3回洗浄した。

(7) 次いで、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgG (アマシャム社製) をPBSで20000倍希釈した液を、ニトロセルロース膜に加え、さらに40分間室温にて反応させた。その後、0.3% Tween 20/PBSで5分間ずつ3回洗浄した。

10 (8) 次いで、ECLキット (アマシャム社製) の発色液を5mlだけニトロセルロース膜に加え、1分間反応させた。その後、このメンブレンをX線フィルムに20秒間露光し、現像した後、写真撮影した。

この結果、いずれの抗体を用いた場合も、ニューラライズド遺伝子を導入したCOS細胞、脳組織、筋肉組織のそれぞれの溶解液でニューラライズド蛋白質の
15 バンドが検出された。これより、抗体Aおよび抗体Bはニューラライズド蛋白質を認識することが確認された。

実施例7 組織染色

ヒトの神経系の組織とヒトの脳組織について、抗体Aおよび抗体Bを用いて下記の操作により免疫染色を行った。

20 (1) ヒトの脳組織をコンバウンドに入れ、凍結ブロックを作製した。そのブロックについて、クライオスタットで凍結切片にし、その切片をスライドグラスに載せた。

(2) 次いで、凍結切片組織を10%バッファードホルマリン処理を10分間行って固定した。その後、PBS (pH 7.5) で5分間ずつ3回洗浄した。さらに
25 0.3% H₂O₂/メタノールで30分処理し、PBSで2回洗浄した。

(3) 0.15% ロバ正常血清/PBSをスライドグラス上の組織の上に載せ、

室温で1時間放置しブロッキングを行った。

(4) 抗体Aおよび抗体Bを $1\mu\text{g}/\text{ml}$ にPBSで希釈したものを、それぞれスライドグラス上の組織に加え、室温で1時間反応させた。その後、PBS (pH 7.5) で5分間ずつ3回洗浄した。

- 5 (5) PBSで1000倍希釈したビオチン化ウサギIgG抗体(アマシャム社製)を組織に加え、室温で1時間反応させた。その後、PBS (pH 7.5) で5分間ずつ3回洗浄した。ペルオキシダーゼ標識化アビジン-ビオチン複合体溶液を加え、40分間反応させた後、PBSで5分間ずつ3回洗浄した。

- 10 (6) 0.1%ジアミノベンジジン(DAB)、0.02% H_2O_2 /PBS (pH 7.5) 液にスライドグラスを浸し、室温にて10分間反応させた。その後、蒸留水にスライドグラスを移し、反応を止めた。ヘマトキシリン染色後、流水で洗浄した。

いずれの抗体を用いた場合も、脳組織においてニューラライズド蛋白質が染色されるのが観察された。

- 15 実施例8 マウスニューラライズドcDNAの単離ならびにその塩基配列および該遺伝子がコードするアミノ酸配列の決定

1. DNA断片の取得

cDNAライブラリーには、マウス新生仔脳cDNAライブラリー(クローンテック社製)を用い、以下の条件でPCRを行った。

- 20 フラグメントAの塩基配列から前記P3プライマーを用いて、マウス新生仔脳cDNAライブラリーを鋳型としてシングルPCRを下記の条件で行った。

マウス新生仔脳cDNAライブラリー ($1\mu\text{g}/\text{ml}$)	$1\mu\text{l}$
dNTPmix	$0.6\mu\text{l}$
P3プライマー	$1\mu\text{l}$
3.3×PCR緩衝液	$4.5\mu\text{l}$
25 mM MgCl_2	$0.72\mu\text{l}$

蒸留水 6.68 μ l

合計 14.5 μ l

- 5 前記組成の液にミネラルオイル15 μ lを重層し、94℃で5分間放置した後、TaqポリメラーゼXL0.5 μ l（登録商標、宝酒造社製）を加え、「94℃で30秒間、60℃で30秒間、続いて72℃で1.5分間」のサイクルを50回繰り返し反応させた。続いて55℃で2分間、最後に72℃で10分間断片の伸長反応を行いPCRを完了した。

このPCR産物を鋳型として2度目のPCRを実施した。前記P4プライマーと、前記T3プライマーを用いて、下記の条件でPCRを行った。

- | | | |
|----|------------------------|--------------|
| 10 | PCR産物 | 2 μ l |
| | dNTPmix | 1 μ l |
| | P4プライマー | 1 μ l |
| | T3プライマー | 1 μ l |
| | 3.3×PCR緩衝液 | 7.5 μ l |
| 15 | 25mM MgCl ₂ | 1.2 μ l |
| | 蒸留水 | 11.8 μ l |
| | 合計 | 24.5 μ l |

- 20 前記組成の液にミネラルオイル20 μ lを重層し、94℃で5分間放置した後、TaqポリメラーゼXL0.5 μ l（登録商標、宝酒造社製）を加え、「94℃で30秒間、60℃で30秒間、続いて72℃で1分間」のサイクルを40回繰り返し反応させた。続いて55℃で2分間、最後に72℃で10分間断片の伸長反応を行いPCRを完了した。このDNA断片を、以降、フラグメントMAという。

- 25 上記で得た5'伸長反応によるフラグメントMAをミニゲル電気泳動（0.75%アガロースゲル）させて、フラグメントMAのバンドをゲルから切り出した。GeneClean（バイオ101社製）でフラグメントMAを回収して、ミニ

ゲル電気泳動でバンドをチェックした。

フラグメントMAを1 μ l取り、99 μ lのTEにて希釈した。260nmでの吸光度(A260)を測定し、DNA濃度を計算した(A260が1.0のときのDNA濃度を50 μ l/mlとした。)。DNA濃度が1 μ l/ μ lになるようにTEでフラグメントMAを希釈した。

この希釈液について、T3プライマーを用いて、ダイターミネーター法により、オートシーケンサー(ABIモデル373A)を用いて、DNAシーケンスを行い、フラグメントMAの塩基配列を決定した。

2. マウスニューラライズドcDNAの取得

5'プライマーとしてフラグメントMAの一部に相当するセンスプライマーP9 5'-GACTCCATCG GGGGCTCCTT CCC-3' (配列表の配列番号17に記載の塩基配列)を、3'プライマーとしてアンチセンスプライマーP10 5'-CTAGGAGCTG CGGTAGGTCT TGA-3' (配列表の配列番号18に記載の塩基配列)をDNA合成機(ABIモデル392)で合成した。

マウス新生仔脳cDNAライブラリー(クローンテック社製)を鋳型として上記のプライマーを用いて下記の条件でPCR反応を行った。

cDNA	1 μ l
dNTPmix	1 μ l
センスプライマー	1 μ l
アンチセンスプライマー	1 μ l
3. 3 \times PCR緩衝液	7.5 μ l
25mM MgCl ₂	1.2 μ l
蒸留水	11.8 μ l
合計	24.5 μ l

前記組成の液にミネラルオイル15 μ lを重層し、96 $^{\circ}$ Cで5分間放置した後、TaqポリメラーゼXL0.5 μ l(登録商標、宝酒造社製)を加え、「94 $^{\circ}$ C

で30秒間、60℃で30秒間、続いて72℃で1.5分間」のサイクルを40回繰り返し反応させた。最後に72℃で10分間断片の伸長反応を行いPCRを完了した。

この全長cDNAをダイターミネーター法でシーケンスした。この遺伝子を、
5 ショウジョウバエのニューラライズド遺伝子のマウスにおけるホモログ遺伝子と認定した。この塩基配列を配列表の配列番号4に示す。またこの遺伝子がコードするマウスニューラライズド蛋白質のアミノ酸配列を配列表の配列番号3に示す。

3. 形質転換体の作製

上記の塩基配列からなるマウスニューラライズド遺伝子をpCRIIベクター
10 (登録商標、インビトロジェン社製)のTAクローニングサイトに挿入し、該ベクターを大腸菌DH5αに導入して形質転換体を作製した。

産業上の利用可能性

ショウジョウバエニューラライズド遺伝子は、神経細胞形成の過程で作動する遺伝子群の一つであり、その欠失によりショウジョウバエでは幼虫期に未熟な神経細胞の異常増殖を引き起こすことから、神経系細胞の増殖・分化誘導シグナルを司る遺伝子と考えられている。本発明により、従来ショウジョウバエで知られていたニューラライズド遺伝子がヒトやマウスといった脊椎動物、より具体的には哺乳類動物にも存在することが明らかとされた。ヒトニューラライズド遺伝子は、
15 脳と筋肉組織に高発現し、悪性腫瘍形成に関与する遺伝子の一つとして有力な候補である。本発明のニューラライズド蛋白質、該蛋白質をコードする遺伝子、該遺伝子のアンチセンス遺伝子、該蛋白質を認識する抗体は脳腫瘍の解析の試薬として有力なツールである。
20

請求の範囲

1. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列を少なくとも有するアミノ酸配列からなる蛋白質。

5 2. 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列を少なくとも有するアミノ酸配列からなる蛋白質。

3. 配列表の配列番号 1 に記載のアミノ酸配列における一または複数のアミノ酸を置換、欠失または付加してなるアミノ酸配列からなる蛋白質。

4. 配列表の配列番号 3 に記載のアミノ酸配列における一または複数のアミノ酸を置換、欠失または付加してなるアミノ酸配列からなる蛋白質。

10 5. 請求項 1 ないし 4 のいずれか一項に記載の蛋白質をコードするポリヌクレオチド。

6. 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドのうちの一部であって、連続する 12 塩基以上からなるポリヌクレオチド。

15 7. 請求項 5 に記載のポリヌクレオチドのアンチセンス鎖の塩基配列からなるアンチセンスポリヌクレオチドまたは該アンチセンスポリヌクレオチドの誘導体のうちの一部であって、連続する 12 塩基以上からなるポリヌクレオチド。

8. 化学修飾された請求項 5 ないし 7 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチド。

20 9. 配列表の配列番号 2 または配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列からなる DNA のホモログである cDNA を取得する方法であって、請求項 5 ないし 8 のいずれか一項に記載のポリヌクレオチドのコード領域部分からなるポリヌクレオチドをプローブとして、cDNA ライブラリーから該プローブとしたポリヌクレオチドとハイブリダイズする cDNA を取得する方法。

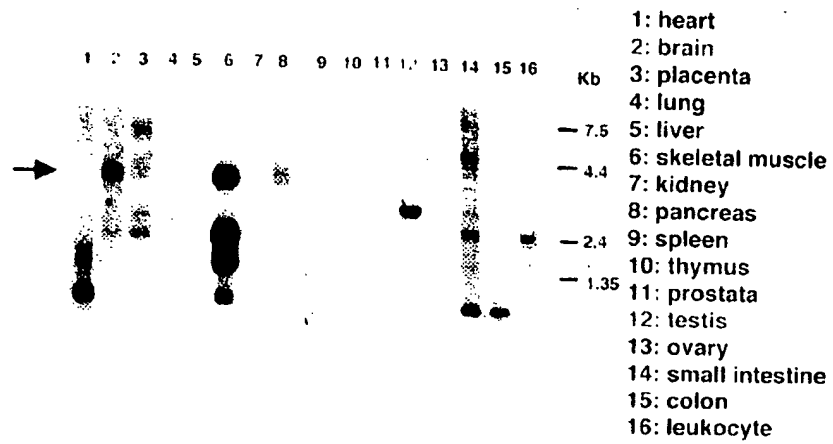
25 10. 配列表の配列番号 2 または配列表の配列番号 4 に記載の塩基配列からなる DNA のホモログであって、請求項 9 に記載の方法によって取得され

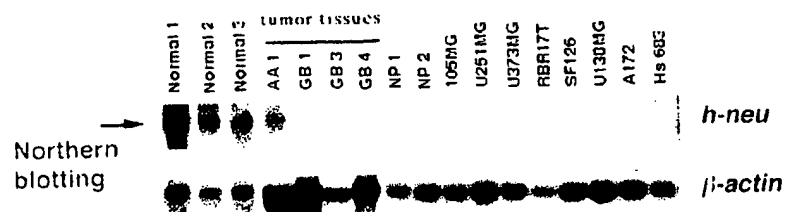
る cDNA。

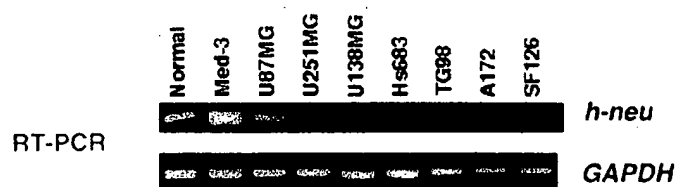
11. 請求項 1 または 2 に記載の蛋白質のホモログであって、請求項 10 に記載の cDNA がコードするアミノ酸配列からなる蛋白質。

12. 請求項 1、2、3、4 または 11 に記載の蛋白質を認識する抗体。

5

 1

2

 3

配列表

SEQUENCE LISTING

<110> SUMOTOMO ELECTRIC INDUSTRIES, LTD

5

<120> A Neurarized protein, a polynucleotide coding the protein and antibody
recognizing the protein

<130> SEI98-31PCT

10

<150> JP 9-313211

<151> 1997-11-14

<160> 23

15

<170> PatentIn Ver. 2.0

<210> 1

<211> 574

20

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

Met Gly Asn Asn Phe Ser Ser Ile Pro Ser Leu Pro Arg Gly Asn Pro

25

1

5

10

15

	Ser Arg Ala Pro Arg Gly His Pro Gln Asn Leu Lys Asp Ser Ile Gly	
	20	25 30
	Gly Pro Phe Pro Val Thr Ser His Arg Cys His His Lys Gln Lys His	
5	35	40 45
	Cys Pro Ala Val Leu Pro Ser Gly Gly Leu Pro Ala Thr Pro Leu Leu	
	50	55 60
10	Phe His Pro His Thr Lys Gly Ser Gln Ile Leu Met Asp Leu Ser His	
	65	70 75 80
	Lys Ala Val Lys Arg Gln Ala Ser Phe Cys Asn Ala Ile Thr Phe Ser	
	85	90 95
15	Asn Arg Pro Val Leu Ile Tyr Glu Gln Val Arg Leu Lys Ile Thr Lys	
	100	105 110
	Lys Gln Cys Cys Trp Ser Gly Ala Leu Arg Leu Gly Phe Thr Ser Lys	
20	115	120 125
	Asp Pro Ser Arg Ile His Pro Asp Ser Leu Pro Lys Tyr Ala Cys Pro	
	130	135 140
25	Asp Leu Val Ser Gln Ser Gly Phe Trp Ala Lys Ala Leu Pro Glu Glu	
	145	150 155 160

Phe Ala Asn Glu Gly Asn Ile Ile Ala Phe Trp Val Asp Lys Lys Gly
165 170 175

Arg Val Phe His Arg Ile Asn Asp Ser Ala Val Met Leu Phe Phe Ser
5 180 185 190

Gly Val Arg Thr Ala Asp Pro Leu Trp Ala Leu Val Asp Val Tyr Gly
195 200 205

Leu Thr Arg Gly Val Gln Leu Leu Asp Ser Glu Leu Val Leu Pro Asp
10 210 215 220

Cys Leu Arg Pro Arg Ser Phe Thr Ala Leu Arg Arg Pro Ser Leu Arg
225 230 235 240

Arg Glu Ala Asp Asp Ala Arg Leu Ser Val Ser Leu Cys Asp Leu Asn
15 245 250 255

Val Pro Gly Ala Asp Gly Asp Glu Ala Ala Pro Ala Ala Gly Cys Pro
20 260 265 270

Ile Pro Gln Asn Ser Leu Asn Ser Gln His Ser Arg Ala Leu Pro Ala
275 280 285

Gln Leu Asp Gly Asp Leu Arg Phe His Ala Leu Arg Ala Gly Ala His
25 290 295 300

	Val Arg Ile Leu Asp Glu Gln Thr Val Ala Arg Val Glu His Gly Arg	
	305	310 315 320
	Asp Glu Arg Ala Leu Val Phe Thr Ser Arg Pro Val Arg Val Ala Glu	
5	325	330 335
	Thr Ile Phe Val Lys Val Thr Arg Ser Gly Gly Ala Arg Pro Gly Ala	
	340	345 350
10	Leu Ser Phe Gly Val Thr Thr Cys Asp Pro Gly Thr Leu Arg Pro Ala	
	355	360 365
	Asp Leu Pro Phe Ser Pro Glu Ala Leu Val Asp Arg Lys Glu Phe Trp	
	370	375 380
15		
	Ala Val Cys Arg Val Pro Gly Pro Leu His Ser Gly Asp Ile Leu Gly	
	385	390 395 400
	Leu Val Val Asn Ala Asp Gly Glu Leu His Leu Ser His Asn Gly Ala	
20	405	410 415
	Ala Ala Gly Met Gln Leu Cys Val Asp Ala Ser Gln Pro Leu Trp Met	
	420	425 430
25	Leu Phe Gly Leu His Gly Thr Ile Thr Gln Ile Arg Ile Leu Gly Ser	
	435	440 445

Thr Ile Leu Ala Glu Arg Gly Ile Pro Ser Leu Pro Cys Ser Pro Ala
 450 455 460

Ser Thr Pro Thr Ser Pro Ser Ala Leu Gly Ser Arg Leu Ser Asp Pro
 5 465 470 475 480

Leu Leu Ser Thr Cys Ser Ser Gly Pro Leu Gly Ser Ser Ala Gly Gly
 485 490 495

10 Thr Ala Pro Asn Ser Pro Val Ser Leu Pro Glu Ser Pro Val Thr Pro
 500 505 510

Gly Leu Gly Gln Trp Ser Asp Glu Cys Thr Ile Cys Tyr Glu His Ala
 515 520 525

15 Val Asp Thr Val Ile Tyr Thr Cys Gly His Met Cys Leu Cys Tyr Ala
 530 535 540

Cys Gly Leu Arg Leu Lys Lys Ala Leu His Ala Cys Cys Pro Ile Cys
 20 545 550 555 560

Arg Arg Pro Ile Lys Asp Ile Ile Lys Thr Tyr Arg Ser Ser
 565 570

25 <210> 2
 <211> 2207

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<221> CDS

5 <222> (411)..(2135)

<400> 2

ccgaacgccc acgccagcga ccctgactct atggccccgg gggagcgcgc cggagccgcc 60

10 gcgccgcccc cccccagccg gaaccctagc gtcccgggga gcaagcgggg agccccgggc 120

gtccccggcc cgggccagg gccctgcttg tgccccccgc tcccgccacg gggcatggga 180

ggcaggtagc ccagctcgcg ccaggacacc cgtggcgggc ggaacccgcc aaggaccgcg 240

15

aagtccagag aaaggaagct gaggagctgc ccgccgccc ccggctgcag ccccagcagg 300

gccctcccc ggtggcgcgc acccgcgccg gcacactcgc acaccgcacc tcagtcctg 360

20 cccggcctcg cccccaccog cgagcgccga acctcctggg gccggatgcc atg ggt 416

Met Gly

1

aac aac ttc tcc agt atc ccc tcg ctg ccc cga gga aac ccg agc cgc 464

25 Asn Asn Phe Ser Ser Ile Pro Ser Leu Pro Arg Gly Asn Pro Ser Arg

5

10

15

gcg ccg cgg ggc cac ccc cag aac ctc aaa gac tct atc ggg ggc ccc 512
 Ala Pro Arg Gly His Pro Gln Asn Leu Lys Asp Ser Ile Gly Gly Pro
 20 25 30

5 ttc ccc gtc act tct cac cga tgc cac cac aag cag aag cac tgt ccg 560
 Phe Pro Val Thr Ser His Arg Cys His His Lys Gln Lys His Cys Pro
 35 40 45 50

10 gca gtg ctg ccc agc ggg ggg ctc cca gcc acg ccg ctg ctc ttc cac 608
 Ala Val Leu Pro Ser Gly Gly Leu Pro Ala Thr Pro Leu Leu Phe His
 55 60 65

15 ccg cac acc aag ggc tcc cag atc ctc atg gac ctc agc cac aag gct 656
 Pro His Thr Lys Gly Ser Gln Ile Leu Met Asp Leu Ser His Lys Ala
 70 75 80

20 gtc aag agg cag gcc agc ttc tgc aac gcc atc acc ttc agc aac cgc 704
 Val Lys Arg Gln Ala Ser Phe Cys Asn Ala Ile Thr Phe Ser Asn Arg
 85 90 95

ccg gtc ctc atc tac gag caa gtc agg ctg aag atc acc aag aag cag 752
 Pro Val Leu Ile Tyr Glu Gln Val Arg Leu Lys Ile Thr Lys Lys Gln
 100 105 110

25 tgc tgc tgg agc ggg gcc ctg cgg ctg ggc ttc acc agc aag gac ccg 800
 Cys Cys Trp Ser Gly Ala Leu Arg Leu Gly Phe Thr Ser Lys Asp Pro

	115	120	125	130	
	tcc cgc atc cac cct gac tcg ctg ccc aag tac gcc tgc ccc gac ctg				848
	Ser Arg Ile His Pro Asp Ser Leu Pro Lys Tyr Ala Cys Pro Asp Leu				
5		135	140	145	
	gtg tcc cag agt ggc ttc tgg gcc aag gcg ctg cct gag gag ttt gcc				896
	Val Ser Gln Ser Gly Phe Trp Ala Lys Ala Leu Pro Glu Glu Phe Ala				
		150	155	160	
10	aat gag ggc aac atc atc gca ttc tgg gtg gac aag aag ggc cgt gtc				944
	Asn Glu Gly Asn Ile Ile Ala Phe Trp Val Asp Lys Lys Gly Arg Val				
		165	170	175	
15	ttc cac cgc atc aac gac tcg gct gtt atg ctg ttc ttc agc ggg gtc				992
	Phe His Arg Ile Asn Asp Ser Ala Val Met Leu Phe Phe Ser Gly Val				
		180	185	190	
	cgc acg gcc gac ccg ctc tgg gcc ctg gtg gac gtc tac ggc ctc acg				1040
20	Arg Thr Ala Asp Pro Leu Trp Ala Leu Val Asp Val Tyr Gly Leu Thr				
		195	200	205	210
	cgg ggc gtc cag ctg ctt gat agc gag ctg gtg ctc ccg gac tgt ctg				1088
	Arg Gly Val Gln Leu Leu Asp Ser Glu Leu Val Leu Pro Asp Cys Leu				
25		215	220	225	

cgg ccg cgc tcc ttc acc gcc ctg cgg cgg ccg tgc ctg cgg cgc gag 1136
 Arg Pro Arg Ser Phe Thr Ala Leu Arg Arg Pro Ser Leu Arg Arg Glu
 230 235 240

5 gcg gac gac gcg cgc ctc tgc gtg agc cta tgc gac ctc aac gtg ccg 1184
 Ala Asp Asp Ala Arg Leu Ser Val Ser Leu Cys Asp Leu Asn Val Pro
 245 250 255

10 ggc gcg gac ggc gac gag gcc gcg ccg gcc gcc ggc tgc ccc atc ccg 1232
 Gly Ala Asp Gly Asp Glu Ala Ala Pro Ala Ala Gly Cys Pro Ile Pro
 260 265 270

15 cag aac tca ctc aac tgc cag cac agc cgc gcg ctg ccg gcg cag ctc 1280
 Gln Asn Ser Leu Asn Ser Gln His Ser Arg Ala Leu Pro Ala Gln Leu
 275 280 285 290

20 gac ggc gac ctg cgt ttc cac gcc ctg cgc gcc ggc gcg cac gtc cgc 1328
 Asp Gly Asp Leu Arg Phe His Ala Leu Arg Ala Gly Ala His Val Arg
 295 300 305

atc ctc gac gag cag acg gtg gcg cgc gtg gag cac ggc cgc gac gag 1376
 Ile Leu Asp Glu Gln Thr Val Ala Arg Val Glu His Gly Arg Asp Glu
 310 315 320

25 cgc gcg ctc gtc ttc acc agc ccg ccc gtg cgc gtg gcc gag acc atc 1424
 Arg Ala Leu Val Phe Thr Ser Arg Pro Val Arg Val Ala Glu Thr Ile

	325	330	335	
	ttc gtc aag gtc acg cgc tcg ggt ggc gcg cgg ccc ggc gcg ctg tcg			1472
	Phe Val Lys Val Thr Arg Ser Gly Gly Ala Arg Pro Gly Ala Leu Ser			
5	340	345	350	
	ttc ggc gtc acc acg tgc gac ccc ggc acg ctg cgg ccg gcc gac ctg			1520
	Phe Gly Val Thr Thr Cys Asp Pro Gly Thr Leu Arg Pro Ala Asp Leu			
	355	360	365	370
10	cct ttc agc cct gag gcc ctg gtg gac cgc aag gaa ttc tgg gcc gtg			1568
	Pro Phe Ser Pro Glu Ala Leu Val Asp Arg Lys Glu Phe Trp Ala Val			
		375	380	385
15	tgc cgc gtg ccc ggg ccc ctg cac agc ggc gac atc ctg ggc ctg gtg			1616
	Cys Arg Val Pro Gly Pro Leu His Ser Gly Asp Ile Leu Gly Leu Val			
	390	395	400	
	gtc aac gcc gac ggc gag ctg cac ctc agc cac aat ggc gcg gcc gcc			1664
20	Val Asn Ala Asp Gly Glu Leu His Leu Ser His Asn Gly Ala Ala Ala			
	405	410	415	
	ggc atg cag ctg tgc gtg gac gcc tcg cag ccg ctt tgg atg ctc ttc			1712
	Gly Met Gln Leu Cys Val Asp Ala Ser Gln Pro Leu Trp Met Leu Phe			
25	420	425	430	

ggc ctg cac ggg acc atc acg cag atc cgc atc ctc ggc tcc act atc 1760
 Gly Leu His Gly Thr Ile Thr Gln Ile Arg Ile Leu Gly Ser Thr Ile
 435 440 445 450

5 ctg gcc gag cgg ggt atc ccg tca ctc ccc tgc tcc cct gcc tcc acg 1808
 Leu Ala Glu Arg Gly Ile Pro Ser Leu Pro Cys Ser Pro Ala Ser Thr
 455 460 465

10 cca acc tcg ccc agt gcc ctg ggc agc cgc ctg tct gac ccc ttg ctc 1856
 Pro Thr Ser Pro Ser Ala Leu Gly Ser Arg Leu Ser Asp Pro Leu Leu
 470 475 480

15 agc acg tgc agc tct ggc cct ctg ggt agc tct gct ggt ggg aca gcc 1904
 Ser Thr Cys Ser Ser Gly Pro Leu Gly Ser Ser Ala Gly Gly Thr Ala
 485 490 495

20 ccc aat tcg cca gtg agc ctg ccc gag tcg cca gtg acc cca ggt ctg 1952
 Pro Asn Ser Pro Val Ser Leu Pro Glu Ser Pro Val Thr Pro Gly Leu
 500 505 510

ggc cag tgg agc gat gag tgc acc att tgc tat gaa cac gcg gtg gac 2000
 Gly Gln Trp Ser Asp Glu Cys Thr Ile Cys Tyr Glu His Ala Val Asp
 515 520 525 530

25 acg gtc atc tac aca tgt ggc cac atg tgc ctc tgc tac gcc tgt ggc 2048
 Thr Val Ile Tyr Thr Cys Gly His Met Cys Leu Cys Tyr Ala Cys Gly

	535	540	545	
	ctg cgc ctc aag aag gct ctg cac gcc tgc tgc ccc atc tgc cgc cgc			2096
	Leu Arg Leu Lys Lys Ala Leu His Ala Cys Cys Pro Ile Cys Arg Arg			
5	550	555	560	
	ccc atc aag gac atc atc aag acc tac cgc agc tcc tag cccgttgagg			2145
	Pro Ile Lys Asp Ile Ile Lys Thr Tyr Arg Ser Ser			
	565	570	575	
10	tggeccatcc cgcataccca tttctcggg cttcagccca gtcccagctg aggaacaagc			2205
	ca			2207
15	<210> 3			
	<211> 546			
	<212> PRT			
	<213> Mus			
20	<400> 3			
	Asp Ser Ile Gly Gly Ser Phe Pro Val Pro Ser His Arg Cys His His			
	1	5	10	15
	Lys Gln Lys His Cys Pro Pro Thr Leu Ser Gly Gly Gly Leu Pro Ala			
25	20	25	30	

Thr Pro Leu Leu Phe His Pro His Thr Lys Gly Ser Gln Ile Leu Met
 35 40 45

Asp Leu Ser His Lys Ala Val Lys Arg Gln Ala Ser Phe Cys Asn Ala
 5 50 55 60

Ile Thr Phe Ser Asn Arg Pro Val Leu Ile Tyr Glu Gln Val Arg Leu
 65 70 75 80

10 Lys Xaa Thr Lys Lys Gln Cys Cys Trp Ser Gly Ala Leu Arg Leu Gly
 85 90 95

Phe Thr Ser Lys Asp Pro Ser Arg Ile His Pro Asp Ser Leu Pro Lys
 100 105 110

15 Tyr Ala Cys Pro Asp Leu Val Ser Gln Ser Gly Phe Trp Ala Lys Ala
 115 120 125

Leu Pro Glu Glu Phe Ala Asn Glu Gly Asn Ile Ile Ala Phe Trp Val
 20 130 135 140

Asp Lys Lys Gly Arg Val Phe Tyr Arg Ile Asn Glu Ser Ala Ala Met
 145 150 155 160

25 Leu Phe Phe Ser Gly Val Arg Thr Val Asp Pro Leu Trp Ala Leu Val
 165 170 175

	Asp Val Tyr Gly Leu Thr Arg Gly Val Gln Leu Leu Asp Ser Glu Leu		
	180	185	190
	Val Leu Pro Asp Cys Leu Arg Pro Arg Ser Phe Thr Ala Leu Arg Arg		
5	195	200	205
	Pro Ser Leu Arg Cys Glu Ala Asp Glu Ala Arg Leu Ser Val Ser Leu		
	210	215	220
10	Cys Asp Leu Asn Val Pro Gly Ala Asp Gly Asp Asp Gly Ala Pro Pro		
	225	230	235 240
	Ala Gly Cys Pro Ile Pro Gln Asn Ser Leu Asn Ser Gln His Ser Arg		
	245	250	255
15	Ala Leu Pro Ala Gln Leu Asp Gly Asp Leu Arg Phe His Ala Leu Arg		
	260	265	270
	Ala Gly Ala His Val Arg Ile Leu Asp Glu Gln Thr Val Ala Arg Leu		
20	275	280	285
	Glu His Gly Arg Asp Glu Arg Ala Leu Val Phe Thr Ser Arg Pro Val		
	290	295	300
25	Ser Val Ala Glu Thr Ile Phe Ile Lys Val Thr Arg Ser Gly Gly Gly		
	305	310	315 320

Arg Glu Gly Ala Leu Ser Phe Gly Val Thr Thr Cys Asp Pro Gly Thr
325 330 335

Leu Arg Pro Ala Asp Leu Pro Phe Ser Pro Glu Ala Leu Val Asp Arg
5 340 345 350

Lys Glu Phe Trp Ala Val Cys Arg Val Pro Gly Pro Leu His Ser Gly
355 360 365

Asp Ile Leu Gly Leu Val Val Asn Ala Asp Gly Glu Leu His Leu Ser
10 370 375 380

His Asn Gly Ala Ala Ala Gly Met Gln Leu Cys Val Asp Ala Ser Gln
385 390 395 400

Pro Leu Trp Met Leu Phe Ser Leu His Gly Ala Ile Thr Gln Val Arg
15 405 410 415

Ile Leu Gly Ser Thr Ile Met Thr Glu Arg Gly Gly Pro Ser Leu Pro
20 420 425 430

Cys Ser Pro Ala Ser Thr Pro Thr Ser Pro Ser Ala Leu Gly Ile Arg
435 440 445

Leu Ser Asp Pro Leu Leu Ser Thr Cys Gly Ser Gly Pro Leu Gly Gly
25 450 455 460

Ser Ala Gly Gly Thr Ala Pro Asn Ser Pro Val Ser Leu Pro Glu Pro
465 470 475 480

Pro Val Thr Pro Gly Leu Gly Gln Trp Ser Asp Glu Cys Thr Ile Cys
5 485 490 495

Tyr Glu His Ala Val Asp Thr Val Ile Tyr Thr Cys Gly His Met Cys
500 505 510

10 Leu Cys Tyr Ser Cys Gly Leu Arg Leu Lys Lys Ala Leu His Ala Cys
515 520 525

Cys Pro Ile Cys Arg Arg Pro Ile Lys Asp Ile Ile Lys Thr Tyr Arg
530 535 540

15 Ser Ser
545

<210> 4

20 <211> 1641
<212> DNA
<213> Mus

<221> CDS

25 <222> (1)..(1641)

<400> 4

gac tcc atc ggg ggc tcc ttc ccg gtg ccc tct cac cga tgc cat cac 48

Asp Ser Ile Gly Gly Ser Phe Pro Val Pro Ser His Arg Cys His His

1 5 10 15

5

aag cag aag cat tgc ccg cct acg ctg tca ggt ggg ggg ctc ccg gcc 96

Lys Gln Lys His Cys Pro Pro Thr Leu Ser Gly Gly Gly Leu Pro Ala

20 25 30

10

acg ccg ctg ctc ttc cac ccc cac act aag ggc tcc cag atc ctc atg 144

Thr Pro Leu Leu Phe His Pro His Thr Lys Gly Ser Gln Ile Leu Met

35 40 45

gac ctc agc cac aag gcc gtc aag agg cag gcc agc ttc tgc aat gcc 192

15 Asp Leu Ser His Lys Ala Val Lys Arg Gln Ala Ser Phe Cys Asn Ala

50 55 60

atc acc ttc agt aac cgc ccg gtg ctc atc tac gag caa gtc agg ctg 240

Ile Thr Phe Ser Asn Arg Pro Val Leu Ile Tyr Glu Gln Val Arg Leu

20 65 70 75 80

aag ntc acc aag aag caa tgc tgc tgg agc ggg gcc ctg cga ctt ggc 288

Lys Xaa Thr Lys Lys Gln Cys Cys Trp Ser Gly Ala Leu Arg Leu Gly

85 90 95

25

ttc acc agc aag gac cct tcc cgc atc cac ccc gac tcg ctg ccc aag 336

Phe Thr Ser Lys Asp Pro Ser Arg Ile His Pro Asp Ser Leu Pro Lys
 100 105 110
 tac gcc tgc cct gac ctg gtg tct cag agt ggc ttc tgg gcc aaa gca 384
 5 Tyr Ala Cys Pro Asp Leu Val Ser Gln Ser Gly Phe Trp Ala Lys Ala
 115 120 125
 ttg cct gag gag ttt gcc aac gag ggc aac atc att gcc ttc tgg gtg 432
 10 Leu Pro Glu Glu Phe Ala Asn Glu Gly Asn Ile Ile Ala Phe Trp Val
 130 135 140
 gac aag aag ggc cgc gtc ttc tac cgg atc aat gag tca gct gct atg 480
 Asp Lys Lys Gly Arg Val Phe Tyr Arg Ile Asn Glu Ser Ala Ala Met
 145 150 155 160
 15 ctt ttc ttc agt ggg gtc cgg acg gtg gac ccg ctc tgg gcc ctg gtg 528
 Leu Phe Phe Ser Gly Val Arg Thr Val Asp Pro Leu Trp Ala Leu Val
 165 170 175
 20 gac gtc tac ggc ctc acg cgg ggt gtc cag ctg cta gac agc gag ctg 576
 Asp Val Tyr Gly Leu Thr Arg Gly Val Gln Leu Leu Asp Ser Glu Leu
 180 185 190
 gtg ctg ccc gac tgc ctg cgg ccg cgc tcc ttc acc gcg ctg cgg cgg 624
 25 Val Leu Pro Asp Cys Leu Arg Pro Arg Ser Phe Thr Ala Leu Arg Arg
 195 200 205

ccg tcg ctg cgg tgc gag gcg gat gaa gcg cgc ctg tcg gtg agc ctg 672
 Pro Ser Leu Arg Cys Glu Ala Asp Glu Ala Arg Leu Ser Val Ser Leu
 210 215 220

5 tgc gac ctc aac gtg ccg gga gcc gac ggc gac gac ggc gca ccg cct 720
 Cys Asp Leu Asn Val Pro Gly Ala Asp Gly Asp Asp Gly Ala Pro Pro
 225 230 235 240

gcc ggc tgc ccg atc ccg cag aac tcg ctc aat tct cag cac agc cgc 768
 10 Ala Gly Cys Pro Ile Pro Gln Asn Ser Leu Asn Ser Gln His Ser Arg
 245 250 255

gcg ctg ccg gcg cag ctc gac ggc gac ctg cgc ttc cac gcg ctt cgc 816
 Ala Leu Pro Ala Gln Leu Asp Gly Asp Leu Arg Phe His Ala Leu Arg
 15 260 265 270

gcc ggc gcg cac gtc cgc atc ctg gac gag cag acg gtg gcg cgc ctg 864
 Ala Gly Ala His Val Arg Ile Leu Asp Glu Gln Thr Val Ala Arg Leu
 275 280 285

20 gag cac ggg cgc gac gag cgc gcg ctc gtc ttc acc agc cgg cct gtg 912
 Glu His Gly Arg Asp Glu Arg Ala Leu Val Phe Thr Ser Arg Pro Val
 290 295 300

25 agc gtg gcc gag acc atc ttc atc aag gtc acg cgc tcg ggc ggg ggg 960
 Ser Val Ala Glu Thr Ile Phe Ile Lys Val Thr Arg Ser Gly Gly Gly

	305	310	315	320	
	cga gcg ggc gcg ctg tcc ttc ggg gtc acc acg tgt gac cct ggc acg				1008
	Arg Ala Gly Ala Leu Ser Phe Gly Val Thr Thr Cys Asp Pro Gly Thr				
5		325	330	335	
	ctg cgg ccc gcg gac ctg ccc ttc agc ccc gag gcc ctg gtg gac cgc				1056
	Leu Arg Pro Ala Asp Leu Pro Phe Ser Pro Glu Ala Leu Val Asp Arg				
		340	345	350	
10	aag gag ttc tgg gcg gtg tgt cgc gtg ccc ggg cct ctg cac agc ggc				1104
	Lys Glu Phe Trp Ala Val Cys Arg Val Pro Gly Pro Leu His Ser Gly				
		355	360	365	
15	gac atc ctg ggc ctg gtg gtc aac gcg gac gga gag ctg cac ctg agt				1152
	Asp Ile Leu Gly Leu Val Val Asn Ala Asp Gly Glu Leu His Leu Ser				
		370	375	380	
	cac aac ggc gcg gcg gcc ggc atg cag ctg tgc gtg gat gcc tcg cag				1200
20	His Asn Gly Ala Ala Ala Gly Met Gln Leu Cys Val Asp Ala Ser Gln				
		385	390	395	400
	ccc ctc tgg atg ctc ttc agc ctg cat ggc gcc atc acg cag gtc cgc				1248
	Pro Leu Trp Met Leu Phe Ser Leu His Gly Ala Ile Thr Gln Val Arg				
25		405	410	415	

atc ctc ggc tcc acc atc atg act gaa cgg ggt ggc cca tct ctc ccc 1296
 Ile Leu Gly Ser Thr Ile Met Thr Glu Arg Gly Gly Pro Ser Leu Pro
 420 425 430

5 tgc tca cct gcc tcc act cca acc tca ccc agt gcc ctg ggc atc cgc 1344
 Cys Ser Pro Ala Ser Thr Pro Thr Ser Pro Ser Ala Leu Gly Ile Arg
 435 440 445

ctc tct gac ccc ctg ctc agc acc tgc ggt tct ggg ccc cta ggt ggc 1392
 10 Leu Ser Asp Pro Leu Leu Ser Thr Cys Gly Ser Gly Pro Leu Gly Gly
 450 455 460

tct gct gga ggg aca gcc ccc aac tca cct gtg agc ctg ccc gag cca 1440
 Ser Ala Gly Gly Thr Ala Pro Asn Ser Pro Val Ser Leu Pro Glu Pro
 15 465 470 475 480

ccg gtg acc cca ggt ctg ggc cag tgg agt gat gaa tgc acc att tgc 1488
 Pro Val Thr Pro Gly Leu Gly Gln Trp Ser Asp Glu Cys Thr Ile Cys
 485 490 495

20 tat gaa cac gca gtg gat aca gtc atc tac acg tgt ggc cac atg tgc 1536
 Tyr Glu His Ala Val Asp Thr Val Ile Tyr Thr Cys Gly His Met Cys
 500 505 510

25 ctg tgc tac tcc tgt ggc ctg cgc ctc aag aag gcc ctg cac gcc tgc 1584
 Leu Cys Tyr Ser Cys Gly Leu Arg Leu Lys Lys Ala Leu His Ala Cys

	515	520	525	
	tgc ccc atc tgc cgt cgc ccc atc aag gac atc atc aag acc tac cgc			1632
	Cys Pro Ile Cys Arg Arg Pro Ile Lys Asp Ile Ile Lys Thr Tyr Arg			
5	530	535	540	
	agc tcc tag			1641
	Ser Ser			
	545			
10				
	<210> 5			
	<211> 23			
	<212> DNA			
	<213> Artificial Sequence			
15				
	<220>			
	<223> Primer			
	<400> 5			
20	tagacgtcca ccagggccca gac			23
	<210> 6			
	<211> 23			
	<212> DNA			
25	<213> Artificial Sequence			

<220>

<223> Primer

<400> 6

5 cggagcactc tccacgactc tat

23

<210> 7

<211> 23

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

15 <400> 7

agcactgccg gacagtgctt ctg

23

<210> 8

<211> 23

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

25

<400> 8

gtggtggcat cgtgagaag tga

23

<210> 9

<211> 17

5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

10

<400> 9

attaaccctc actaaag

17

<210> 10

15

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Primer

<400> 10

ggccgtgtct tccaccgcat caa

23

25

<210> 11

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

5 <223> Primer

<400> 11

ctcggctgtt atgctgttct tca

23

10 <210> 12

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

15 <220>

<223> Primer

<400> 12

aatacgactc actatag

17

20

<210> 13

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

25

<220>

<223> Primer

<400> 13

gtggacgcct cgcagccgct ttg

23

5

<210> 14

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

10

<220>

<223> Primer

<400> 14

15

cgatgagtgc accatttgct atg

23

<210> 15

<211> 23

<212> DNA

20

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

25

<400> 15

agagcagcag aggtggctgc act

23

<210> 16
<211> 23
<212> DNA
<213> Artificial Sequence

5

<220>
<223> Primer

<400> 16
10 ggcttgttcc tcagctggga ctg

23

<210> 17
<211> 23
<212> DNA
15 <213> Artificial Sequence

<220>
<223> Primer

20 <400> 17
gactccatcg ggggtcctt ccc

23

<210> 18
<211> 23
25 <212> DNA
<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

<400> 18

5 ctaggagctg cggtaggtct tga

23

<210> 19

<211> 23

<212> DNA

10 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

15 <400> 19

agctgggtgct cccggactgt ctg

23

<210> 20

<211> 23

20 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

25

<400> 20

agctggtgct cccggactgt ctg

23

<210> 21

<211> 21

5

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Primer

10

<400> 21

aaggctgggg ctcatattgca g

21

<210> 22

15

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

20

<223> Primer

<400> 22

ccaaattcgt tgcatacca gg

22

25

<210> 23

<211> 577

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 23

5 cagctggacg ccccgntgna ggccgtagac gtccaccagg gccagagcg ggtcggccgt 60
gcggaacccgc tgaagaacag cataacagcc gaggcgttga tgcgggtgaa gacacggccc 120
ttcttgcca ccagaatgc gatgatgtg ccctcattgc caaactcctc aggcagcgct 180
ntggcccaga agccactctg ggacaccagg ttcggggcag gcgtacttgg gcagcgagtc 240
agggtggatg cgggacgggt ccttgctggt gaagccagcc gcaggccccg ctccagcact 300
10 gcttcttggt gatcttcagc ctgacttgct cgtagatgag gaccgggcgg ttgctgaagg 360
tgatgncgtt gcagaagctg gcctgcctct tgnacagcct tgggctgag gtccatgagg 420
atctgggagc ccttggtgtg cgggtggaag agcagcggcg tggctgggag cccccgctgg 480
gcagcactgc cggacagtgc ttctgcttgt ggtggcatcg gtgagaagtg acggggaagg 540
ggccccgat agagtctgg agagtctcc gggatgat 577

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP98/03737

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER Int.Cl ⁶ C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C07K16/18, C12P21/08 According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) Int.Cl ⁶ C12N15/12, C07K14/47, C12Q1/68, C07K16/18, C12P21/08 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) WPI (DIALOG), BIOSYS (DIALOG), MEDLINE (STN), JICST File (JOIS), Genbank/EMBL/DDBJ/Geneseq, SwissProt/PIR/Geneseq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	Oncogene, Vol. 16[8] (1998-Feb.-26) Nakamura H. et al., "Identification of a human homolog of the <i>Drosophila neuralized</i> gene within the 10q25.1 malignant astrocytoma deletion region" p.1009-1019	1-12
X	EMBL, Rel. 45 (1995) Hillier L. et al., "yn02d01.r1 Homo sapiens cDNA clone 167233 5'" Accession No. R90763	10
X	EMBL, Rel. 45 (1995) Hillier L. et al., "ys70e12.r1 Homo sapiens cDNA clone 220174 5'" Accession No. H82634	10
X	EMBL, Rel. 45 (1995) Hillier L. et al., "yo31e03.r1 Homo sapiens cDNA clone 179548 5'" Accession No. H51467	10
X	EMBL, Rel. 48 (1996) Hillier L. et al., "zb35d12.s1 Soares parathyroid tumor NbHPA Homo sapiens cDNA clone 305591 3'" Accession No. N89880	10
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed		"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family
Date of the actual completion of the international search 28 September, 1998 (28. 09. 98)		Date of mailing of the international search report 6 October, 1998 (06. 10. 98)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office Facsimile No.		Authorized officer Telephone No.

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)